

10/500160

25 JUL 2004

REC'D 03 MAR 2003

WIPO

PCT/JPC2/1378 PCT

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

27.12.02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月28日

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-093096

[ST.10/C]:

[JP2002-093096]

出 願 人

Applicant(s):

武田薬品工業株式会社

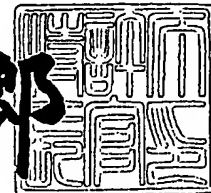
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 2月12日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3006608

BEST AVAILABLE COPY

特 2002-093096

【書類名】 特許願

【整理番号】 B02106

【提出日】 平成14年 3月28日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ1  
204号

【氏名】 松本 寛和

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市二の宮1丁目10番地19 ファンタブ  
ル二の宮I棟205号

【氏名】 野口 次郎

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市東2丁目14番地5 仕黒マンション2  
01号

【氏名】 原田 美穂子

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市春日3丁目8番地5

【氏名】 森 正明

【特許出願人】

【識別番号】 000002934

【氏名又は名称】 武田薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100114041

【弁理士】

【氏名又は名称】 高橋 秀一

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2001-403260

特 2 0 0 2 - 0 9 3 0 9 6

【出願日】 平成13年12月28日

【整理番号】 B01515

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005142

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9909276

【プルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】体重増加抑制剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる体重増加抑制剤。

【請求項2】配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる体重減少剤。

【請求項3】配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる脂肪量増加抑制剤。

【請求項4】配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる摂食抑制剤。

【請求項5】配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬のスクリーニング方法。

【請求項6】配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬のスクリーニング用キット。

【請求項7】請求項5記載のスクリーニング方法または請求項6記載のスクリーニング用キットを用いて得られる体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬。

【請求項8】請求項5記載のスクリーニング方法または請求項6記載のスクリーニング用キットを用いて得られる体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬を含有してなる医薬。



【請求項 9】 配列番号：18 で表わされる塩基配列を含有する DNA を含有してなる体重増加抑制剤。

【請求項 10】 配列番号：18 で表わされる塩基配列を含有する DNA を含有してなる体重減少剤。

【請求項 11】 配列番号：18 で表わされる塩基配列を含有する DNA を含有してなる脂肪量増加抑制剤。

【請求項 12】 配列番号：18 で表わされる塩基配列を含有する DNA を含有してなる摂食抑制剤。

【請求項 13】 配列番号：18 で表わされる塩基配列を含有する DNA を用いることを特徴とする体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬のスクリーニング方法。

【請求項 14】 配列番号：18 で表わされる塩基配列を含有する DNA を含有することを特徴とする体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬のスクリーニング用キット。

【請求項 15】 請求項 13 記載のスクリーニング方法または請求項 14 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬。

【請求項 16】 請求項 13 記載のスクリーニング方法または請求項 14 記載のスクリーニング用キットを用いて得られる体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬を含有してなる医薬。

【請求項 17】 配列番号：149 で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド。

【請求項 18】 標識された請求項 17 記載のポリペプチド。

【請求項 19】 請求項 17 記載のポリペプチドを用いる請求項 5 記載のスクリーニング方法。

【請求項 20】 (i) 請求項 17 記載のポリペプチド、および (ii) 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138 または配列番号：144 で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いる請求項 19 記載のスクリーニング方

法。

【請求項21】請求項18記載のポリペプチドを用いる請求項20記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は体重増加抑制剤、体重減少剤などに関する。

【0002】

【従来の技術】

糖尿病をはじめとする生活習慣病の増加は、PPAR $\gamma$ などのいわゆる俊約遺伝子に代表される飢餓状態に備えて脂肪を蓄積する方向性をもった生体機能が、現代の高脂肪食を中心とした食生活または運動不足といった生活環境に適応できなくなっていることが主な原因されている。その結果としての肥満は、糖尿病の原因となるだけでなく、高血圧などのリスクファクターともなるため、副作用の少ない安全な抗肥満薬の開発は、多くの生活習慣病の発症を防ぐことに繋がり、医療経済的に最も要求度の高いものの一つである。こうした抗肥満薬として、現在、カテコラミン・セロトニン再取り込み阻害剤であるsibutramineおよび脂肪吸収阻害剤であるorlistatが使用されている。その他、熱産生促進薬の $\beta$ 3アゴニスト、中枢性摂食抑制薬ニューロペプチドYアンタゴニスト、メラノコルチン受容体サブタイプ4アゴニストなどが開発あるいは研究途上にある(J.C. Claphamら、Pharmacol. Ther., 89巻、81-121頁、2001年、M. Chiesiら、Trends Pharmacol. Sci., 22巻、247-54頁、2001年)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、さらに新たなメカニズムに基づく作用の強力で副作用の少ない安全な体重増加抑制剤、体重減少剤の開発が望まれていた。

【0004】

【課題を解決するための手段】

本発明者たちは上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、GPR8

と結合する内因性リガンドが体重増加抑制活性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0005】

すなわち、本発明は、

(1) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる体重増加抑制剤、

(2) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる体重減少剤、

(3) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる脂肪量増加抑制剤、

(4) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる摂食抑制剤、

(5) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬のスクリーニング方法、

(6) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有することを特徴とする体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬のスクリーニング用キット、

(7) 上記(5)記載のスクリーニング方法または上記(6)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬、

(8) 上記(5)記載のスクリーニング方法または上記(6)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬

または摂食抑制薬を含有してなる医薬、

(9) 配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAを含有してなる体重増加抑制剤、

(10) 配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAを含有してなる体重減少剤、

(11) 配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAを含有してなる脂肪量増加抑制剤、

(12) 配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAを含有してなる摂食抑制剤、

(13) 配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAを用いることを特徴とする体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬のスクリーニング方法、

(14) 配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAを含有することを特徴とする体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬のスクリーニング用キット、

(15) 上記(13)記載のスクリーニング方法または上記(14)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬、

(16) 上記(13)記載のスクリーニング方法または上記(14)記載のスクリーニング用キットを用いて得られる体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬または摂食抑制薬を含有してなる医薬、

(17) 配列番号：149で表されるアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド、

(18) 標識された上記(17)記載のポリペプチド、

(19) 上記(17)記載のポリペプチドを用いる上記(5)記載のスクリーニング方法、

(20) (i) 請求項17記載のポリペプチド、および(ii) 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質を用いる請

求項19記載のスクリーニング方法、

(21) 上記(18)記載のポリペプチドを用いる上記(20)記載のスクリーニング方法などを提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】

本発明で用いられる配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチド（以下、本発明のポリペプチドと称する場合がある）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巢、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など）に由来するポリペプチドであってもよく、合成ポリペプチドであってもよい。

【0007】

配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とし

ては、配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と約90%以上、好ましくは約95%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、上記のアミノ酸配列の他、

(i) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(ii) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

(iii) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列に1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

(iv) 配列番号：16で表されるアミノ酸配列中の1～5個（好ましくは1～3個、さらに好ましくは1～2個、より好ましくは、1個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、

(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

【0008】

配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドとしては、例えば、前記の配列番号：16で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：16で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドなどが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、本発明のポリペプチドの有する活性（例、体重増加抑制作用、体重減少作用、脂肪量増加抑制作用、摂食抑制作用）などがあげられる。

実質的に同質の活性とは、それらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。

配列番号：16で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、例えば、配列番号：6、配列番号：17、配列番号：20、配列番号：21、配列番号：22、配列番号：23、配列番号：24、配列番号：25、配列番号：56、配列番号：57、配列番号：73、配列番号：74、配列番号：91、配列番号：92、配列番号：95、配列番号：96、配列番号：97、配列番号：98、配列番号：99、配列番号：100、配列番号：101、配列番号：102、配列番号：103、配列番号：104、配列番号：105、配列番号：106、配列番号：107、配列番号：108、配列番号：109、配列番号：110、配列番号：111、配列番号：112、配列番号：113または配列番号：149で表されるアミノ酸配列などがあげられる。

【0009】

本発明のポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：16で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：6で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：17で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：20で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：21で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：22で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：23で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：24で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：25で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：56で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：57で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：73で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：74で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：91で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：92で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：95で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：96で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：97で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：98で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：99で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：100で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：101で表されるア

ミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：102で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：103で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：104で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：105で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：106で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：107で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：108で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：109で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：110で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：111で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：112で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号：113で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号：149で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどのGPR8と特異的に結合する能力を有するポリペプチドがあげられる。

また、本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの前駆体ポリペプチドをも包含する意味で用いられる。

該前駆体ポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号：15で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするポリペプチド等があげられる。

より、具体的には、

配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

特に、配列番号：15で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、上記のアミノ酸配列の他、

- (i) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、
- (ii) 配列番号：15で表されるアミノ酸配列に1～100個（好ましくは1～



50個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個)のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、

(iii)配列番号:15で表されるアミノ酸配列に1～15個(好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個)のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、

(iv)配列番号:15で表されるアミノ酸配列中の1～15個(好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、

(v)上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号:15で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列の具体例としては、例えば、配列番号:42、配列番号:55、配列番号:72または配列番号:90で表されるアミノ酸配列などがあげられる。

上記前駆体ポリペプチドの具体例としては、例えば、配列番号:15で表わされるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号:42で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号:55で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号:72で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドおよび配列番号:90で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどがあげられる。

#### 【0010】

本発明のポリペプチドに対する受容体としては、種々の受容体のうち、本発明のポリペプチドと結合活性を有し、本発明のポリペプチドにより該受容体発現細胞の細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成/抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTPγS結合活性などを促進する活性等)が観察されるものなどがあげられる。

具体的には、(1)GPR8(配列番号:4;Genomics、28巻、84-91頁、1995年)、またはGPR8と実質的に同一のアミノ酸配列(配列番号:4で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質)、(2)配列

番号：126で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する受容体、(3) 配列番号：138で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有する受容体、(4) GPR7 (配列番号：144 ; Genomics、28巻、84-91頁、1995年) などがあげられる。

配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質、配列番号：126で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質、配列番号：138で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質、配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質(以下、本発明の受容体と称する場合がある)は、ヒトや温血動物(例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど)の細胞(例えば、網膜細胞、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、脾臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞(例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球)、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれらの細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など)もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位(例、網膜、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳)、脊髄、下垂体、胃、脾臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管(例、大腸、小腸)、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞(例えば、MEL, M1, CTLL-2, HT-2, WEHI-3, HL-60, JOSK-1, K562, ML-1, MOLT-3, MOLT-4, MOLT-10, CCRF-CEM, TALL-1, Jurkat, CCRT-HSB-2, KE-37, SKW-3, HUT-78, HUT-102, H9, U937, THP-1, HEL, JK-1, CMK, KO-812, MEG-01など)に由来する蛋白質であってもよく、合成蛋白質であってもよい。

【0011】

配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：126で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：126で表されるアミノ酸配列と85%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：138で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、例えば、配列番号：138で表されるアミノ酸配列と86%以上、好ましくは約90%以上、より好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。

配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質としては、例えば、配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有し、配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質などが好ましい。

配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、(i) 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(ii)

配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(i) 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表されるアミノ酸配列に1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(iv) 配列番号：4、配列番号：126、配列番号：138または配列番号：144で表されるアミノ酸配列中の1～15個（好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個、より好ましくは、1～3個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、(v) 上記(i)～(iv)を組み合わせたアミノ酸配列などがあげられる。

本発明の受容体の具体例としては、例えば、配列番号：4で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質、配列番号：126で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質、配列番号：138で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質、配列番号：144で表されるアミノ酸配列を含有する蛋白質などが用いられる。

#### 【0012】

本発明のポリペプチドに対する受容体の部分ペプチド（以下、本発明の部分ペプチドと称する場合がある）としては、後述の医薬等のスクリーニング方法に用いることのできる部分ペプチドであれば、いかなるものであってもよいが、好ましくは、本発明のポリペプチドに対する結合能を有する部分ペプチド、細胞膜外領域に相当するアミノ酸配列を含有する部分ペプチド等が用いられる。本発明の受容体の構成アミノ酸配列のうち20個以上、好ましくは50個以上、より好ましくは100個以上のアミノ酸配列を有するペプチドなどが好ましい。(i) 上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が欠失し、(ii) 上記アミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1～5個））のアミノ酸が付加し、または(iii) 上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個、さらに好ましくは1～5個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で

置換されていてもよい。

具体例としては、(a) 配列番号：4 で表されるアミノ酸配列中、1 番目 (Met) ~ 123 番目 (Phe) のアミノ酸残基からなる部分アミノ酸配列もしくはその一部、301 番目 (Asn) ~ 358 番目 (Lys) のアミノ酸残基からなる部分アミノ酸配列もしくはその一部、548 番目 (Tyr) ~ 593 番目 (Arg) のアミノ酸残基からなる部分アミノ酸配列もしくはその一部、および 843 番目 (Ala) ~ 895 番目 (Ile) のアミノ酸残基からなる部分アミノ酸配列もしくはその一部から選択される 1 または 2 以上の部分アミノ酸配列を含有する部分ペプチド、(b) 配列番号：126 で表されるアミノ酸配列中、1 番目 (Met) ~ 85 番目 (Asp) のアミノ酸残基からなる部分アミノ酸配列もしくはその一部、または 222 番目 (Cys) ~ 329 番目 (Ala) のアミノ酸残基からなる部分アミノ酸配列もしくはその一部を含有するペプチドなどがあげられる。

#### 【0013】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、ペプチド標記の慣例に従って左端が N 末端 (アミノ末端)、右端が C 末端 (カルボキシル末端) である。本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、C 末端がカルボキシル基 ( $-\text{COOH}$ )、カルボキシレート ( $-\text{COO}^-$ )、アミド ( $-\text{CONH}_2$ ) またはエステル ( $-\text{COOR}$ ) の何れであってもよい。

ここでエステルにおける R としては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは *n*-ブチルなどの  $\text{C}_{1-6}$  アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの  $\text{C}_{3-8}$  シクロアルキル基、例えば、フェニル、 $\alpha$ -ナフチルなどの  $\text{C}_{6-12}$  アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- $\text{C}_{1-2}$  アルキル基もしくは  $\alpha$ -ナフチルメチルなどの  $\alpha$ -ナフチル- $\text{C}_{1-2}$  アルキル基などの  $\text{C}_{7-14}$  アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるビバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドが C 末端以外にカルボキシル基 (またはカルボキシレート) を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のポリペプチドに含まれる。この

場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドには、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイルなどのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば-OH、-SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC<sub>1-6</sub>アルカノイル基などのC<sub>1-6</sub>アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

#### 【0014】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、前述したヒトや温血動物の細胞または組織から公知のポリペプチドの精製方法によって製造することもできるし、後述するポリペプチドをコードするDNAで形質転換された形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

#### 【0015】

本発明のポリペプチド、受容体、その部分ペプチド、もしくはそれらの塩、ま

たはそれらのアミド体の合成には、通常市販のポリペプチド合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などをあげることができる。このような樹脂を用い、 $\alpha$ -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするポリペプチドの配列通りに、公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からポリペプチドを切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のポリペプチド、受容体、部分ペプチドまたはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、ポリペプチド合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤(例えば、HOBt、HOObt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOObtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、ポリペプチド縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、N,N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル、プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル、酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反

応温度はポリペプチド結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約 $-20^{\circ}\text{C}$ ～ $50^{\circ}\text{C}$ の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常1.5～4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

## 【0016】

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、*t*-ベンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、*t*-ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、*t*-ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（ $\text{C}_{1-6}$ ）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、*t*-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl<sub>2</sub>-



Bz1、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

【0017】

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から

適宜選択しうる。

【0018】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（ポリペプチド）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の $\alpha$ -アミノ基の保護基のみを除いたポリペプチドとC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したポリペプチドとを製造し、この両ポリペプチドを上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護ポリペプチドを精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗ポリペプチドを得ることができる。この粗ポリペプチドは既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのアミド体を得ることができる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、ポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのアミド体と同様にして、所望のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドのエステル体を得ることができる。

【0019】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドは、公知のペプチドの合成法に従って、あるいは受容体の部分ペプチドについては、受容体を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の(a)～(e)に記載された方法があげられる。

(a) M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synt

hesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

(b) SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(ThePeptide); Academic Press, New York (1965年)

(c) 泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

(d) 矢島治明および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

(e) 矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができる。逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

#### 【0020】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotalRNAまたはmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase ChainReaction (以下、RT-PCR法と略称する)によって増幅することもできる。

#### 【0021】

本発明のポリペプチドをコードするDNAとしては、例えば (a) 配列番号：18、配列番号：19、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配

列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：75、配列番号：76、配列番号：93、配列番号：94、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：121、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124、配列番号：125または配列番号：150で表わされる塩基配列を含有するDNA、(b) 配列番号：18、配列番号：19、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：75、配列番号：76、配列番号：93、配列番号：94、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：121、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124、配列番号：125または配列番号：150で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のポリペプチドと実質的に同質の活性を有するポリペプチドをコードするDNA、(c) 配列番号：14、配列番号：41、配列番号：54、配列番号：71または配列番号：89で表わされる塩基配列を含有するDNA、または(d) 配列番号：14、配列番号：41、配列番号：54、配列番号：71または配列番号：89で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAなどであれば何れのものでよい。

(i) 配列番号：18、配列番号：19、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：75、配列番号：76、配列番号：93、配列番号：94、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：121、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124、配列番号：125または配列番号：150で表わされる塩基配列、または(ii) 配列番号：14、配列番号：41、配列番号：54、配列番号：71または配列番号：89で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイ

ズできるDNAとしては、例えば、それぞれ (i) 配列番号：18、配列番号：19、配列番号：26、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29、配列番号：30、配列番号：31、配列番号：58、配列番号：59、配列番号：75、配列番号：76、配列番号：93、配列番号：94、配列番号：114、配列番号：115、配列番号：116、配列番号：117、配列番号：118、配列番号：119、配列番号：120、配列番号：121、配列番号：122、配列番号：123、配列番号：124、配列番号：125または配列番号：150で表される塩基配列、または (ii) 配列番号：14、配列番号：41、配列番号：54、配列番号：71または配列番号：89で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

#### 【0022】

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、

- (i) 配列番号：16で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、
- (ii) 配列番号：17で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：19で表わされる塩基配列を含有するDNA

などが用いられ、

(iii) 配列番号：20で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：26で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(iv) 配列番号：21で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：27で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(v) 配列番号：22で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：28で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(vi) 配列番号：23で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：29で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(vii) 配列番号：24で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：30で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(viii) 配列番号：25で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：31で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(ix) 配列番号：56で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：58で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(x) 配列番号：57で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：59で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xi) 配列番号：73で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：75で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xii) 配列番号：74で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコー

ドするDNAとしては、配列番号：76で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xiii)配列番号：91で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：93で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xiv)配列番号：92で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：94で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xv)配列番号：95で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xvi)配列番号：96で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：114で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xvii)配列番号：97で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：115で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xviii)配列番号：98で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：116で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xix)配列番号：99で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：117で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xx)配列番号：100で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：118で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxi)配列番号：101で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：119で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxii) 配列番号：102で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：120で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxiii) 配列番号：103で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：58で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxiv) 配列番号：104で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：75で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxv) 配列番号：105で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxvi) 配列番号：106で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：18で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxvii) 配列番号：107で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：121で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxviii) 配列番号：108で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：122で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxix) 配列番号：109で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：123で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxx) 配列番号：110で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：124で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられ、

(xxxi) 配列番号：6で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードするDNAとしては、配列番号：125で表わされる塩基配列を含有するDNA



などが用いられ、

(xxxii) 配列番号：111 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：121 で表わされる塩基配列を含有する DNA などが用いられ、

(xxxiii) 配列番号：112 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：18 で表わされる塩基配列を含有する DNA などが用いられ、

(xxxiv) 配列番号：113 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：121 で表わされる塩基配列を含有する DNA などが用いられ、

(xxxv) 配列番号：149 で表わされるアミノ酸配列を含有するポリペプチドをコードする DNA としては、配列番号：150 で表わされる塩基配列を含有する DNA などが用いられる。

# 【0023】

本発明の受容体をコードする DNA としては、例えば、(1) 配列番号：32 で表される塩基配列を含有する DNA、または配列番号：32 で表わされる塩基配列とハイスロリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：4 で表されるアミノ酸を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードする DNA、(2) 配列番号：127 で表される塩基配列を含有する DNA、または配列番号：32 で表わされる塩基配列とハイスロリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：126 で表されるアミノ酸を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードする DNA、(3) 配列番号：139 で表される塩基配列を含有する DNA、または配列番号：139 で表わされる塩基配列とハイスロリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：138 で表されるアミノ酸を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードする DNA、(4) 配列番号：143 で表される塩基配列を含有する DNA、または配列番号：143 で表わされる塩基配列とハイスロリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：143 で表されるアミノ酸を含有する蛋白質と実質的に同

質の活性を有する蛋白質をコードするDNAなどであれば何れのものでよい。

配列番号：32、配列番号：127、配列番号：139または配列番号：143で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、それぞれ配列番号：32、配列番号：127、配列番号：139または配列番号：143で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0024】

ハイブリダイゼーションは、公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19~40 mM、好ましくは約19~20 mMで、温度が約50~70℃、好ましくは約60~65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

より具体的には、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：32で表わされる塩基配列を含有するDNA、配列番号：126で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：127で表わされる塩基配列を含有するDNA、配列番号：138で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：139で表わされる塩基配列を含有するDNA、配列番号：144で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：143で表わされる塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

【0025】

本発明の受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明

の受容体の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。

本発明の受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、(1) 配列番号：32で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：32で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：4で表されるアミノ酸を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNA、(2) 配列番号：127で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：127で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：126で表されるアミノ酸を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNA、(3) 配列番号：139で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：138で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：126で表されるアミノ酸を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNA、(4) 配列番号：143で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNA、または配列番号：143で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、配列番号：144で表されるアミノ酸を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNAなどが用いられる。

配列番号：32、配列番号：127、配列番号：139または配列番号：143で表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAは、前記と同意義を示す。

ハイブリダイゼーションの方法およびハイストリンジェントな条件は前記と同様のものが用いられる。

また、本発明の受容体の部分ペプチドをコードするDNAとしてより具体的には、配列番号：4で表されるアミノ酸配列中、1番目(Met)～43番目(Phe)、101番目(Asn)～118番目(Lys)、188番目(Tyr)～213番目(Arg)および283番目(Ala)～295番目(Ile)で表される部分アミノ酸配列から選択される1または2以上の部分アミノ酸配列を含有する部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、またはこれらとハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有するDNAを含有するDNAなどがあげられる。

【0026】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードするDNAは、公知の方法で標識化されていてもよく、具体的にはアイソトープラベル化されたもの、蛍光標識されたもの(例えば、フルオレセインなどによる蛍光標識)、ビオチン化されたものまたは酵素標識されたものなどがあげられる。好ましくはアイソトープラベル化された本発明のポリペプチドが用いられる。

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチド(以下、これらポリペプチド等をコードするDNAのクローニングおよび発現の説明においては、これらポリペプチド等を単に本発明のポリペプチドと略記する場合がある)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のポリペプチドの部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いて公知のPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDNAを本発明のポリペプチドの一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したもののハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) 2nd(J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989)に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

【0027】

DNAの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutan<sup>TM</sup>-super Express Km(宝酒造(株))、Mutan<sup>TM</sup>-K(宝酒造(株))等を用いて、ODA-LAPCR法、Ga

pped duplex法、Kunkel法等の公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたポリペプチドをコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

#### 【0028】

本発明のポリペプチドの発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のポリペプチドをコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15)、 $\lambda$ ファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR $\alpha$ プロモーター、SV40プロモーター、HIV-LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどがあげられる。

これらのうち、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 $\lambda$ PLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモータ

ーなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp<sup>r</sup>と略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo<sup>r</sup>と略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のポリペプチドのN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 $\alpha$ -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF $\alpha$ ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 $\alpha$ -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のポリペプチドをコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

#### 【0029】

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ（*Escherichia coli*）K12・DH1〔プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc.Natl. Acad. Sci. USA）, 60巻, 160（1968）〕, JM103〔ヌクイレック・アシッ

ズ・リサーチ (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22, AH22R<sup>-</sup>, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12, シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (Pichia pastoris) KM71 などが用いられる。

#### 【0030】

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell; Sf細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のMG1細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five<sup>TM</sup>細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmene acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori N細胞; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる [前田ら、ネイチャー (Nature), 315巻, 592(1985)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスAtT-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞

などが用いられる。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene), 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics), 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology), 194巻, 182-187(1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

#### 【0031】

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology, 6, 47-55(1988)) などに記載の方法に従って行なうことができる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 263-267(1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology), 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、ポリペプチドをコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグ



ネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

【0032】

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地〔Bostian, K. L. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 77巻, 4505 (1980)] や0.5% カザミノ酸を含有するSD培地〔Bitter, G. A. ら、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 81巻, 5330 (1984)] があげられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー (Nature), 195, 788 (1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻,

501(1952)], DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6~8であるのが好ましい。培養は通常約30℃~40℃で約15~60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内、細胞膜または細胞外などに本発明のポリペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のポリペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

#### 【0033】

本発明のポリペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび/または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりポリペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトン X-100<sup>TM</sup>などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にポリペプチドが分泌される場合には、培養終了後、公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるポリペプチドの精製は、公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用

いられる。

かくして得られるポリペプチドが遊離体で得られた場合には、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するポリペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

#### 【0034】

本発明のポリペプチドに対する抗体（以下、単に本発明の抗体と称する場合がある）は、本発明のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のポリペプチドに対する抗体は、本発明のポリペプチドを抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

#### 〔モノクローナル抗体の作製〕

##### （a）モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のポリペプチドは、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物

の骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化ポリペプチドと抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256、495 (1975)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルスなどがあげられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髓腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1などの温血動物の骨髓腫細胞があげられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は1:1～20:1程度であり、PEG（好ましくはPEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、20～40℃、好ましくは30～37℃で1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、ポリペプチド（蛋白質）抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識された抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識されたポリペプチドを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などがあげられる。

モノクローナル抗体の選別は、公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常HAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-1.01、日水製薬（株））などを用

いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

#### (b) モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

#### 【0035】

##### 〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（ポリペプチド抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のポリペプチドに対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは

担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

#### 【0036】

本発明のポリペプチド、受容体またはその部分ペプチドをコードするDNA（以下、これらのDNAを本発明のDNAと略記する場合がある）に相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有するアンチセンスDNA（以下、これらのDNAをアンチセンスDNAと略記する場合がある）としては、本発明のDNAに相補的な、または実質的に相補的な塩基配列を有し、該DNAの発現を抑制し得る作用を有するものであれば、いずれのアンチセンスDNAであってもよい。

本発明のDNAに実質的に相補的な塩基配列とは、例えば、本発明のDNAに相補的な塩基配列（すなわち、本発明のDNAの相補鎖）の全塩基配列あるいは部分塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列などがあげられる。特に、本発明のDNAの相補鎖の全塩基配列うち、本発明のポリペプチドのN末端部位をコードする部分の塩基配列（例えば、開始コドン付近の塩基配列など）の相補鎖と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアンチセンスDNAが好適である。これらのアンチセンスDNAは、公知のDNA合成装置などを用いて製造することができる。

以下に、(a) 本発明のポリペプチド、(b) 本発明のDNA、(c) 本発明の抗体、および(d) アンチセンスDNAの用途を説明する。

#### 【0037】

(1) 本発明のポリペプチドが関与する各種疾病の治療・予防剤

本発明のポリペプチドは、GPR8、GPR7、ラットTGR26またはマウスTGR26などの本発明の受容体発現細胞の細胞刺激活性を有し、GPR8、ヒトGPR7、ラットTGR26またはマウスTGR26などの本発明の受容体)の内因性リガンドである。

従って本発明のポリペプチドまたは本発明のDNAに異常があったり、欠損している場合、または本発明の受容体または該受容体をコードするDNAに異常があったり、欠損している場合には、例えば、体重増加となる可能性が高い。従って、本発明のポリペプチドおよび本発明のDNAは、例えば、体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤として使用することができる。また、例えば肥満症〔例、悪性肥満細胞症(malignant mastocytosis)、外因性肥満(exogenous obesity)、過インシュリン性肥満症(hyperinsulinarobesity)、過血漿性肥満(hyperplasmic obesity)、下垂体性肥満(hypophyseal adiposity)、減血漿性肥満(hypoplasmicobesity)、甲状腺機能低下肥満症(hypothyroid obesity)、視床下部性肥満(hypothalamic obesity)、症候性肥満症(symptomaticobesity)、小児肥満(infantile obesity)、上半身肥満(upper body obesity)、食事性肥満症(alimentaryobesity)、性機能低下性肥満(hypogonadal obesity)、全身性肥満細胞症(systemic mastocytosis)、単純性肥満(simpleobesity)、中心性肥満(central obesity)など〕の予防治療剤として使用することができる。

【0038】

本発明のポリペプチドおよび本発明のDNAは、例えば、生体内において本発明のポリペプチドが減少あるいは欠損している患者がいる場合に、(イ)本発明のDNAを該患者に投与し、生体内で本発明のポリペプチドを発現させることによって、(ロ)細胞に本発明のDNAを挿入し、本発明のポリペプチドを発現させた後に、該細胞を患者に移植することによって、または(ハ)本発明のポリペプチドを該患者に投与することなどによって、該患者における本発明のポリペプチドの役割を十分に、あるいは正常に発揮させることができる。

本発明のDNAを上記の治療・予防剤として使用する場合は、該DNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスア

ソシエテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って、ヒトまたは温血動物に投与することができる。本発明のDNAは、そのままで、あるいは摂取促進のための補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

本発明のポリペプチドを上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも90%、好ましくは95%以上、より好ましくは98%以上、さらに好ましくは99%以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のポリペプチドは、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的（好ましくは皮下投与）に使用できる。例えば、本発明のポリペプチドを生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

#### 【0039】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのようない甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのようない香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のようない液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようないベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのようない天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムな



ど)などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール(例えば、エタノールなど)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート80<sup>TM</sup>、HCO-50など)などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤(例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など)、無痛化剤(例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

本発明のDNAが挿入されたベクターも上記と同様に製剤化され、通常、非経口的に使用される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物(例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など)に対して投与することができる。

#### 【0040】

本発明のポリペプチドの投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、体重増加抑制の目的で本発明のポリペプチドを皮下投与する場合、一般的に成人(60kgとして)においては、一日につき該ポリペプチドを約0.1mg~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

#### 【0041】

##### (2) 疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のポリペプチドは本発明の受容体のリガンドとしての機能などを有するため、本発明のポリペプチドの機能を促進する化合物またはその塩は、例えば、体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬、摂食抑制薬などとして有用であり、体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤などとして使用できる。

一方、本発明のポリペプチドの機能を阻害する化合物またはその塩は、例えば体重増加薬として有用であり、体重増加剤などとして有用である。

該スクリーニングは、本発明のポリペプチドを用いるか、または組換え型本発明のポリペプチドの発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のポリペプチドとその受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）（例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など）またはその塩をスクリーニングすることができる。このような化合物には、本発明の受容体を介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $Ca^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成／抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTP $\gamma$ S 結合活性などを促進する活性など）を有する化合物（即ち本発明のポリペプチドの受容体アゴニスト）と該細胞刺激活性を有しない化合物（即ち本発明のポリペプチドの受容体アンタゴニスト）などが含まれる。「本発明のポリペプチドとの結合性を変化させる」とは、本発明のポリペプチドとの結合を阻害する場合と本発明のポリペプチドとの結合を促進する場合の両方を包含するものである。

#### 【0042】

本発明のポリペプチドを用いることを特徴とする本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法の具体例としては、(i) 本発明の受容体またはその部分ペプチド（以下、これらを単に本発明の受容体と略称する場合がある）に、本発明のポリペプチドを接触させた場合と (ii) 上記した本発明の受容体に、本発明のポリペプチドおよび試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体の結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法が挙げられる。

上記スクリーニング方法においては、(i) 上記した本発明の受容体に、本発明のポリペプチドを接触させた場合と (ii) 上記した本発明の受容体に、本発明のポリペプチドおよび試験化合物を接触させた場合における、例えば該本発明の

受容体に対するリガンドの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較する。

【0043】

上記スクリーニング方法のさらなる具体例としては、

(a) 標識された本発明のポリペプチドを、上記した本発明の受容体に接触させた場合と、標識された本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体に接触させた場合における、標識された本発明のポリペプチドの本発明の受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、

(b) 標識された本発明のポリペプチドを、本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合と、標識された本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識された本発明のポリペプチドの該細胞または該膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、

(c) 標識された本発明のポリペプチドを、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体に接触させた場合と、標識された本発明のポリペプチドおよび試験化合物を本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明のポリペプチドの受容体に接触させた場合における、標識された本発明のポリペプチドの本発明の受容体に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、

【0044】

(d) 本発明の受容体を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチド）を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の受容体を活性化する化合物および試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合に

おける、本発明の受容体を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成／抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP $\gamma$ S結合活性などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法、および（e）本発明の受容体を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドなど）を本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体に接触させた場合と、本発明の受容体を活性化する化合物および試験化合物を、本発明の受容体をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現した本発明の受容体に接触させた場合における、本発明の受容体を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 $Ca^{2+}$ 遊離、細胞内cAMP生成／抑制、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下、GTP $\gamma$ S結合活性などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）またはその塩のスクリーニング方法などである。

標識された本発明のポリペプチドの好ましい具体例は、 $[^{125}I]$ で標識された配列番号：149で表されるアミノ酸配列を有するポリペプチドなどが挙げられる。

#### 【0045】

上記スクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いる本発明の受容体としては、本発明のポリペプチドをリガンドとして認識するものであれば何れのものであってもよいが、ヒトや温血動物の臓器の膜面分などが好適である。しかし、特にヒト由来の臓器は入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとして

は、組換え体を用いて大量発現させた本発明の受容体などが適している。

本発明の受容体を製造するには、前述の本発明のポリペプチドの製造方法などが用いられる。

本発明のスクリーニング方法において、本発明の受容体を含有する細胞あるいは該細胞膜画分などを用いる場合、後述の調製法に従えばよい。

本発明の受容体を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。固定化方法は公知の方法に従って行うことができる。

本発明の受容体を含有する細胞としては、本発明の受容体を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、前述の大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。また、本発明の受容体を発現した宿主細胞は、前述の本発明のポリペプチドを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体の製造方法と同様の方法などがあげられる。

膜画分としては、細胞を破碎した後、公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン（Kinematica社製）による破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などがあげられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈殿を膜画分とする。該膜画分中には、発現した本発明の受容体と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該本発明の受容体を含有する細胞や膜画分中の本発明の受容体の量は、1細胞当たり $10^3 \sim 10^8$ 分子であるのが好ましく、 $10^5 \sim 10^7$ 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

【0046】

本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）をスクリーニングする前記の（a）～（c）を実施するためには、適当な本発明の受容体画分と、標識された本発明のポリペプチドなどが用いられる。本発明の受容体画分としては、天然型の本発明の受容体画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型本発明の受容体画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識されたポリペプチドとしては、例えば  $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$  などて標識されたポリペプチドなどを利用することができる。このうち好ましくは、 $[^{125}\text{I}]$  で標識されたポリペプチドである。

具体的には、本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を变化させる化合物のスクリーニングを行うには、まず本発明の受容体を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH 4～10（望ましくは pH 6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>TM</sup>（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによる本発明の受容体や本発明のポリペプチドの分解を抑える目的で PMSF、ロイペプチン、E-64（ペプチド研究所製）、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01 ml～10 ml の該レセプター溶液に、一定量（5000 cpm～500000 cpm）の標識された本発明のポリペプチドを添加し、同時に  $10^{-10}$ ～ $10^{-7}$  M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量（NSB）を知るために大過剰の未標識の本発明のポリペプチドを加えた反応チューブも用意する。反応は 0℃ から 50℃、望ましくは 4℃ から 37℃ で 20 分から 24 時間、望ましくは 30 分から 3 時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたは γ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント（ $B_0$ ）から非特

異的結合量 (NSB) を引いたカウント ( $B_0 - \text{NSB}$ ) を 100% とした時、特異的結合量 ( $B - \text{NSB}$ ) が例えば 50% 以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

## 【0047】

本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）をスクリーニングする前記の (d) ~ (e) の方法を実施するためには、本発明の受容体を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  遊離、細胞内 cAMP 生成／抑制、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下、GTP  $\gamma$  S 結合活性などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、本発明の受容体を含む細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行うにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP 産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することができる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当な本発明の受容体を発現した細胞が必要である。本発明の受容体を発現した細胞としては、前述の本発明の受容体発現細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えばペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられる。

## 【0048】

本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる化合物（本発

明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物) またはその塩のスクリーニング用キットは、本発明の受容体またはその塩、本発明の受容体の部分ペプチドまたはその塩、本発明の受容体を含有する細胞、あるいは本発明の受容体を含有する細胞の膜画分、および本発明のポリペプチドを含有するものである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

## 1. スクリーニング用試薬

### (a) 測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

### (b) 本発明の受容体標品

本発明の受容体を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $5 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%  $\text{CO}_2$ 、95% airで2日間培養したもの。

### (c) 標識リガンド

$[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$  などて標識された本発明のポリペプチドを適当な溶媒または緩衝液に溶解したものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu\text{M}$  に希釈する。

### (d) リガンド標準液

本発明のポリペプチドを0.1%ウシ血清アルブミン (シグマ社製) を含むPBSで1 mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

【0049】

## 2. 測定法

(a) 12穴組織培養用プレートにて培養した本発明の受容体を発現させた細胞を、測定用緩衝液1 mlで2回洗浄した後、490  $\mu\text{l}$  の測定用緩衝液を各穴に加える。

(b)  $10^{-3} \sim 10^{-10}$  Mの試験化合物溶液を5  $\mu\text{l}$  加えた後、標識された本発明のペプチドを5  $\mu\text{l}$  加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに $10^{-3}$  Mの本発明のポリペプチドを5  $\mu\text{l}$  加えてお



く。

(c) 反応液を除去し、1 ml の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識された本発明のポリペプチドを0.2 N NaOH-1% SDSで溶解し、4 ml の液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。

(d) 液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、PercentMaximum Binding (PMB) を次の式〔数1〕で求める。

〔数1〕

$$\text{PMB} = [ (B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB}) ] \times 100$$

PMB : PercentMaximum Binding

B : 検体を加えた時の値

NSB : Non-specificBinding (非特異的結合量)

B<sub>0</sub> : 最大結合量

【0050】

上記スクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合を変化させる（結合を阻害あるいは促進する）化合物（本発明のポリペプチドの活性を促進または阻害する化合物）であり、具体的には本発明の受容体を介して細胞刺激活性を有する化合物またはその塩（いわゆる本発明の受容体アゴニスト）、あるいは該刺激活性を有しない化合物（いわゆる本発明の受容体アンタゴニスト）である。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

上記本発明の受容体アゴニストであるかアンタゴニストであるかの具体的な評価方法は以下の(i)または(ii)に従えばよい。

(i) 前記(a)～(c)のスクリーニング方法で示されるバインディング・アッセイを行い、本発明のポリペプチドと本発明の受容体との結合性を変化させる（特に、結合を阻害する）化合物を得た後、該化合物が上記した本発明の受容体を介する細胞刺激活性を有しているか否かを測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニストであり、該活性を有しない化合物ま

たはその塩は本発明の受容体アンタゴニストである。

(ii) (a) 試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させ、上記本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定する。細胞刺激活性を有する化合物またはその塩は本発明の受容体アゴニストである。

(b) 本発明の受容体を活性化する化合物（例えば、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体アゴニストなど）を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合と、本発明の受容体を活性化する化合物および試験化合物を本発明の受容体を含有する細胞に接触させた場合における、本発明の受容体を介した細胞刺激活性を測定し、比較する。本発明の受容体を活性化する化合物による細胞刺激活性を減少させ得る化合物またはその塩は本発明の受容体アンタゴニストである。

上記本発明の受容体アゴニストは、本発明の受容体に対する本発明のポリペプチドが有する生理活性と同様の作用を有しているので、本発明のポリペプチドと同様に体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬、摂食抑制薬として有用であり、安全で低毒性な体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤などとして使用することができる。

上記本発明の受容体アンタゴニストは、本発明の受容体に対する本発明のポリペプチドが有する生理活性を抑制することができるので、体重増加薬として有用であり、安全で低毒性な体重増加剤などとして使用することができる。

#### 【0051】

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの機能を促進または阻害する化合物である。

該化合物の塩としては、前記した本発明のポリペプチドの塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上述の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にし

て、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、体重増加抑制の目的で本発明のポリペプチドの機能を促進する化合物を皮下投与する場合、一般的に成人（体重60kg当たり）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

また、例えば、体重増加の目的で本発明のポリペプチドの機能を阻害する化合物を皮下投与する場合、一般的に成人（体重60kg当たり）においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

#### 【0052】

#### （3）本発明のポリペプチドの定量

本発明のポリペプチドに対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のポリペプチドを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のポリペプチドの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

(i) 本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のポリペプチドとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のポリペプチドの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドの定量法、および

(ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のポリペプチドの定量法を提供す

る。

上記(ii)の定量法においては、一方の抗体が本発明のポリペプチドのN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のポリペプチドのC端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を用いて本発明のポリペプチドの定量を行うことができるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ 、あるいは $Fab$ 画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のポリペプチドの定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、ポリペプチド量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

#### 【0053】

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常ポリペプチドあるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの

不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のポリペプチド量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

#### 【 0 0 5 4 】

本発明のサンドイッチ法による本発明のポリペプチドの測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のポリペプチドの結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のポリペプチドのＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ、Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用地第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗

体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のポリペプチドの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D : Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E : Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques (Part I : Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のポリペプチドを感度良く定量することができる。

【0055】

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のポリペプチドの濃度を定量すること

によって、本発明のポリペプチドの濃度の減少が検出された場合、例えば、体重増加または脂肪量増加である、または将来体重が増加または脂肪量が増加する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明のポリペプチドの濃度の増加が検出された場合には、例えば、体重減少などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のポリペプチドを検出するために使用することができる。また、本発明のポリペプチドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のポリペプチドの検出、被検細胞内における本発明のポリペプチドの挙動の分析などのために使用することができる。

#### 【0056】

#### (4) 遺伝子診断剤

本発明のDNAは、例えば、プローブとして使用することにより、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）における本発明のポリペプチドをコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

本発明のDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス (Genomics), 第5巻, 874~879頁（1989年）、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ユーエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 第86巻, 2766~2770頁（1989年））などにより実施することができる。

例えば、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現低下が検出された場合は、例えば、体重増加または脂肪量増加である可能性が高いまたは将来体重が増加または脂肪量が増加する可能性が高いと診断することができる。

また、ノーザンハイブリダイゼーションにより発現過多が検出された場合は、例えば、体重減少などである可能性が高いまたは将来体重減少する可能性が高いと診断することができる。

【0057】

(5) アンチセンスDNAを含有する医薬

本発明のDNAに相補的に結合し、該DNAの発現を抑制することができるアンチセンスDNAは、例えば、体重増加剤などとして使用することができる。

例えば、該アンチセンスDNAを用いる場合、該アンチセンスDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って実施することができる。該アンチセンスDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のために補助剤などの生理学的に認められる担体とともに製剤化し、遺伝子銃やヒドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

さらに、該アンチセンスDNAは、組織や細胞における本発明のDNAの存在やその発現状況を調べるための診断用オリゴヌクレオチドプローブとして使用することもできる。

【0058】

(6) 本発明の抗体を含有する医薬

本発明のポリペプチドを中和する作用を有する本発明の抗体は、例えば、体重増加剤などとして使用することができる。

本発明の抗体を含有する上記疾患の剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の体重増加抑制のために使用する場合には、本発明の抗体を1回量として、通常0.01~20mg/kg体重程度、好ましくは0.1~10mg/kg体重程度、さらに好ましくは0.1~5mg/kg体重程度を、1日1~5回程度、好ましくは1日1~3回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与



することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぶん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

#### 【 0 0 5 9 】

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート 8 0、HCO-5 0 (polyoxyethylene (5 0 mol) adduct of hydrogenated castor oil) 〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するよう

な投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常5～500mg、とりわけ注射剤では5～100mg、その他の剤形では10～250mgの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお前記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

【0060】

(7) DNA転移動物

外来性の本発明のポリペプチドをコードするDNA（以下、本発明の外来性DNAと略記する）またはその変異DNA（本発明の外来性変異DNAと略記する場合がある）を有する非ヒト哺乳動物も、体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤などをスクリーニングするために用いられる。

本発明の外来性DNAまたはその変異DNAを有する非ヒト哺乳動物（以下、本発明のDNA転移動物と略記する）は、未受精卵、受精卵、精子およびその始原細胞を含む胚芽細胞などに対して、好ましくは、非ヒト哺乳動物の発生における胚発生の段階（さらに好ましくは、単細胞または受精卵細胞の段階でかつ一般に8細胞期以前）に、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、DEAE-デキストラン法などにより目的とするDNAを転移することによって作出することができる。また、該DNA転移方法により、体細胞、生体の臓器、組織細胞などに目的とする本発明の外来性DNAを転移し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、これら細胞を上述の胚芽細胞と公知の細胞融合法により融合させることにより本発明のDNA転移動物を作出することもできる。

非ヒト哺乳動物としては、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラットなどが用いられる。なかでも、病体動物モデル系の作成の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、また、繁殖が容易なゲッ歯動物、とりわけマウス（例えば、純系として、C57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系として、B6C3F<sub>1</sub>系統、BDF<sub>1</sub>系

統、B6D2F<sub>1</sub>系統、BALB/c系統、ICR系統など）またはラット（例えば、Wistar、SDなど）などが好ましい。

哺乳動物において発現しうる組換えベクターにおける「哺乳動物」としては、上記の非ヒト哺乳動物の他にヒトなどがあげられる。

【0061】

本発明の外來性DNAとは、非ヒト哺乳動物が本来有している本発明のDNAではなく、いったん哺乳動物から単離・抽出された本発明のDNAをいう。

本発明の変異DNAとしては、元の本発明のDNAの塩基配列に変異（例えば、突然変異など）が生じたもの、具体的には、塩基の付加、欠損、他の塩基への置換などが生じたDNAなどが用いられ、また、異常DNAも含まれる。

該異常DNAとしては、異常な本発明のポリペプチドを発現させるDNAを意味し、例えば、正常な本発明のポリペプチドの機能を抑制するポリペプチドを発現させるDNAなどが用いられる。

本発明の外來性DNAは、対象とする動物と同種あるいは異種のどちらの哺乳動物由来のものであってもよい。本発明のDNAを対象動物に転移させるにあたっては、該DNAを動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合したDNAコンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、本発明のヒトDNAを転移させる場合、これと相溶性が高い本発明のDNAを有する各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のDNAを発現させうる各種プロモーターの下流に、本発明のヒトDNAを結合したDNAコンストラクト（例、ベクターなど）を対象哺乳動物の受精卵、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のDNAを高発現するDNA転移哺乳動物を作出することができる。

【0062】

本発明のポリペプチドの発現ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミド、酵母由来のプラスミド、スファージなどのバクテリオファージ、モロニー白血病毒などのレトロウイルス、ワクシニアウイルスまたはバキュロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。なかでも、大腸菌由来のプラスミド、枯草菌由来のプラスミドまたは酵母由来のプラスミドなどが

好ましく用いられる。

上記のDNA発現調節を行なうプロモーターとしては、例えば、(a) ウイルス（例、シミアンウイルス、サイトメガロウイルス、モロニー白血病ウイルス、JCウイルス、乳癌ウイルス、ポリオウイルスなど）に由来するDNAのプロモーター、(b) 各種哺乳動物（ヒト、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来のプロモーター、例えば、アルブミン、インスリンII、ウロプラキンII、エラスターゼ、エリスロポエチン、エンドセリン、筋クレアチンキナーゼ、グリア線維性酸性蛋白質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、血小板由来成長因子 $\beta$ 、ケラチンK1、K10およびK14、コラーゲンI型およびII型、サイクリックAMP依存蛋白質キナーゼ $\beta$ Iサブユニット、ジストロフィン、酒石酸抵抗性アルカリフォスファターゼ、心房ナトリウム利尿性因子、内皮レセプターチロシンキナーゼ（一般にTie2と略される）、ナトリウムカリウムアデノシン3リン酸化酵素（Na, K-ATPase）、ニューロフィラメント軽鎖、メタロチオネインIおよびIIA、メタロプロテインナーゼ1組織インヒビター、MHCクラスI抗原（H-2L）、H-ras、レニン、ドーパミン $\beta$ -水酸化酵素、甲状腺ペルオキシダーゼ（TPO）、ポリペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）、 $\beta$ アクチン、 $\alpha$ および $\beta$ ミオシン重鎖、ミオシン軽鎖1および2、ミエリン基礎蛋白質、チログロブリン、Thy-1、免疫グロブリン、H鎖可変部（VN $\beta$ ）、血清アミロイドPコンポーネント、ミオグロビン、トロポニンC、平滑筋 $\alpha$ アクチン、プレプロエンケファリンA、バソプレシンなどのプロモーターなどが用いられる。なかでも、全身で高発現することが可能なサイトメガロウイルスプロモーター、ヒトポリペプチド鎖延長因子1 $\alpha$ （EF-1 $\alpha$ ）のプロモーター、ヒトおよびニワトリ $\beta$ アクチンプロモーターなどが好適である。

上記ベクターは、DNA転移哺乳動物において目的とするメッセンジャーRNAの転写を終結する配列（一般にターミネーターと呼ばれる）を有していることが好ましく、例えば、ウイルス由来および各種哺乳動物由来の各DNAの配列を用いることができ、好ましくは、シミアンウイルスのSV40ターミネーターなどが用いられる。

【0063】

その他、目的とする外来性DNAをさらに高発現させる目的で各DNAのスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核DNAのイントロンの一部などをプロモーター領域の5'上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の3'下流に連結することも目的により可能である。

正常な本発明のポリペプチドの翻訳領域は、ヒトまたは各種哺乳動物（例えば、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなど）由来の肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来DNAおよび市販の各種ゲノムDNAライブラリーよりゲノムDNAの全てあるいは一部として、または肝臓、腎臓、甲状腺細胞、線維芽細胞由来RNAより公知の方法により調製された相補DNAを原料として取得することが出来る。また、外来性の異常DNAは、上記の細胞または組織より得られた正常なポリペプチドの翻訳領域を点突然変異誘発法により変異した翻訳領域を作製することができる。

該翻訳領域は転移動物において発現しうるDNAコンストラクトとして、前記のプロモーターの下流および所望により転写終結部位の上流に連結させる通常のDNA工学的手法により作製することができる。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において、本発明の外来性DNAが存在することは、作出動物の後代がすべて、その胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを保持することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞のすべてに本発明の外来性DNAを有する。

本発明の外来性正常DNAを転移させた非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。

受精卵細胞段階における本発明の外来性DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに過剰に存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の外来性DNAが過剰に存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過

剰に有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の外来性DNAを過剰に有する。

導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを過剰に有するように繁殖継代することができる。

【0064】

本発明の正常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の正常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を促進することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能亢進症を発症することがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の正常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能亢進症や、本発明のポリペプチドに関連する疾患の病態機序の解明およびこれらの疾患の治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、本発明の外来性正常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドに関連する疾患に対する治療薬のスクリーニング試験にも利用可能である。

一方、本発明の外来性異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、交配により外来性DNAを安定に保持することを確認して該DNA保有動物として通常の飼育環境で継代飼育することが出来る。さらに、目的とする外来DNAを前述のプラスミドに組み込んで原料として用いることができる。プロモーターとのDNAコンストラクトは、通常のDNA工学的手法によって作製することができる。受精卵細胞段階における本発明の異常DNAの転移は、対象哺乳動物の胚芽細胞および体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明の異常DNAが存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有することを意味する。本発明の外来性DNAを受け継いだこの種の動物の子孫は、その胚芽細胞および体細胞の全てに本発明の異常DNAを有する。導入DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

【0065】

本発明の異常DNAを有する非ヒト哺乳動物は、本発明の異常DNAが高発現させられており、内在性の正常DNAの機能を阻害することにより最終的に本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症となることがあり、その病態モデル動物として利用することができる。例えば、本発明の異常DNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症の病態機序の解明およびこの疾患を治療方法の検討を行なうことが可能である。

また、具体的な利用可能性としては、本発明の異常DNA高発現動物は、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症における本発明の異常ポリペプチドによる正常ポリペプチドの機能阻害（dominant negative作用）を解明するモデルとなる。

また、本発明の外来異常DNAを転移させた哺乳動物は、遊離した本発明のポリペプチドの増加症状を有することから、本発明のポリペプチドまたはの機能不活性型不応症に対する治療薬スクリーニング試験にも利用可能である。

また、上記2種類の本発明のDNA転移動物のその他の利用可能性として、例えば、

- (a) 組織培養のための細胞源としての使用、
- (b) 本発明のDNA転移動物の組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、またはDNAにより発現されたポリペプチド組織を分析することによる、本発明のポリペプチドにより特異的に発現あるいは活性化するポリペプチドとの関連性についての解析、
- (c) DNAを有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、一般に培養困難な組織からの細胞の機能の研究、
- (d) 上記(c)記載の細胞を用いることによる細胞の機能を高めるような薬剤のスクリーニング、および
- (e) 本発明の変異ポリペプチドを単離精製およびその抗体作製などが考えられる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症などを含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の臨床症状を調べ

ることができ、また、本発明のポリペプチドに関連する疾患モデルの各臓器におけるより詳細な病理学的所見が得られ、新しい治療方法の開発、さらには、該疾患による二次的疾患の研究および治療に貢献することができる。

また、本発明のDNA転移動物から各臓器を取り出し、細切後、トリプシンなどの蛋白質分解酵素により、遊離したDNA転移細胞の取得、その培養またはその培養細胞の系統化を行なうことが可能である。さらに、本発明のポリペプチド産生細胞の特定化、アポトーシス、分化あるいは増殖との関連性、またはそれらにおけるシグナル伝達機構を調べ、それらの異常を調べることなどができ、本発明のポリペプチドおよびその作用解明のための有効な研究材料となる。

さらに、本発明のDNA転移動物を用いて、本発明のポリペプチドの機能不活性型不応症を含む、本発明のポリペプチドに関連する疾患の治療薬の開発を行なうために、上述の検査法および定量法などを用いて、有効で迅速な該疾患治療薬のスクリーニング法を提供することが可能となる。また、本発明のDNA転移動物または本発明の外來性DNA発現ベクターを用いて、本発明のポリペプチドが関連する疾患のDNA治療法を検討、開発することが可能である。

#### 【0066】

##### (8) ノックアウト動物

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞および本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物も、体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤をスクリーニングするために用いられる。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞とは、該非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAに人為的に変異を加えることにより、DNAの発現能を抑制するか、もしくは該DNAがコードしている本発明のポリペプチドの活性を実質的に喪失させることにより、DNAが実質的に本発明のポリペプチドの発現能を有さない（以下、本発明のノックアウトDNAと称することがある）非ヒト哺乳動物の胚幹細胞（以下、ES細胞と略記する）をいう。

非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNAに人為的に変異を加える方法としては、例えば、遺伝子工学的手法により該DNA配列の一部又は全部の削除、他DNAを挿入または置換させ



ることによって行なうことができる。これらの変異により、例えば、コドンの読み取り枠をずらしたり、プロモーターあるいはエキソンの機能を破壊することにより本発明のノックアウトDNAを作製すればよい。

## 【0067】

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞（以下、本発明のDNA不活性化ES細胞または本発明のノックアウトES細胞と略記する）の具体例としては、例えば、目的とする非ヒト哺乳動物が有する本発明のDNAを単離し、そのエキソン部分にネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子を代表とする薬剤耐性遺伝子、あるいはlacZ（ $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子）、cat（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子）を代表とするレポーター遺伝子等を挿入することによりエキソンの機能を破壊するか、あるいはエキソン間のイントロン部分に遺伝子の転写を終結させるDNA配列（例えば、polyA付加シグナルなど）を挿入し、完全なメッセンジャーRNAを合成できなくすることによって、結果的に遺伝子を破壊するように構築したDNA配列を有するDNA鎖（以下、ターゲッティングベクターと略記する）を、例えば相同組換え法により該動物の染色体に導入し、得られたES細胞について本発明のDNA上あるいはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析あるいはターゲッティングベクター上のDNA配列とターゲッティングベクター作製に使用した本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列をプライマーとしたPCR法により解析し、本発明のノックアウトES細胞を選別することにより得ることができる。

また、相同組換え法等により本発明のDNAを不活化させる元のES細胞としては、例えば、前述のような既に樹立されたものを用いてもよく、また公知 EvansとKaufmanの方法に準じて新しく樹立したものでもよい。例えば、マウスのES細胞の場合、現在、一般的には129系のES細胞が使用されているが、免疫学的背景がはっきりしていないので、これに代わる純系で免疫学的に遺伝的背景が明らかなES細胞を取得するなどの目的で例えば、C57BL/6マウスやC57BL/6の採卵数の少なさをDBA/2との交雑により改善したBDF<sub>1</sub>マウス（C57BL/6とDBA/2とのF<sub>1</sub>）を用いて樹立したものなども良好に

用いうる。BDF<sub>1</sub>マウスは、採卵数が多く、かつ、卵が丈夫であるという利点に加えて、C57BL/6マウスを背景に持つので、これを用いて得られたES細胞は病態モデルマウスを作出したとき、C57BL/6マウスとバッククロスすることでその遺伝的背景をC57BL/6マウスに代えることが可能である点で有利に用い得る。

また、ES細胞を樹立する場合、一般には受精後3.5日目の胚盤胞を使用するが、これ以外に8細胞期胚を採卵し胚盤胞まで培養して用いることにより効率よく多数の初期胚を取得することができる。

また、雌雄いずれのES細胞を用いてもよいが、通常雄のES細胞の方が生殖系列キメラを作出するのに都合が良い。また、煩雑な培養の手間を削減するためにもできるだけ早く雌雄の判別を行なうことが望ましい。

#### 【0068】

ES細胞の雌雄の判定方法としては、例えば、PCR法によりY染色体上の性決定領域の遺伝子を増幅、検出する方法が、その1例としてあげることができる。この方法を使用すれば、従来、核型分析をするのに約 $10^6$ 個の細胞数を要していたのに対して、1コロニー程度のES細胞数（約50個）で済むので、培養初期におけるES細胞の第一次セレクションを雌雄の判別で行なうことが可能であり、早期に雄細胞の選定を可能にしたことにより培養初期の手間は大幅に削減できる。

また、第二次セレクションとしては、例えば、G-バンディング法による染色体数の確認等により行うことができる。得られるES細胞の染色体数は正常数の100%が望ましいが、樹立の際の物理的操作等の関係上困難な場合は、ES細胞の遺伝子をノックアウトした後、正常細胞（例えば、マウスでは染色体数が $2n=40$ である細胞）に再びクローニングすることが望ましい。

このようにして得られた胚幹細胞株は、通常その増殖性は大変良いが、個体発生できる能力を失いやすいので、注意深く継代培養することが必要である。例えば、STO繊維芽細胞のような適当なフィーダー細胞上でLIF（1-10000U/ml）存在下に炭酸ガス培養器内（好ましくは、5%炭酸ガス、95%空気または5%酸素、5%炭酸ガス、90%空気）で約37℃で培養するなどの方法で

培養し、継代時には、例えば、トリプシン／EDTA溶液（通常0.001－0.05%トリプシン／0.1－5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン／1 mM EDTA）処理により単細胞化し、新たに用意したフィーダー細胞上に播種する方法などがとられる。このような継代は、通常1－3日毎に行なうが、この際に細胞の観察を行い、形態的に異常な細胞が見受けられた場合はその培養細胞は放棄することが望まれる。

ES細胞は、適当な条件により、高密度に至るまで単層培養するか、または細胞集塊を形成するまで浮遊培養することにより、頭頂筋、内臓筋、心筋などの種々のタイプの細胞に分化させることが可能であり【M. J. Evans及びM. H. Kaufman, ネイチャー (Nature) 第292巻、154頁、1981年；G. R. Martin プロシーディングス・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 第78巻、7634頁、1981年；T.C. Doetschmanら、ジャーナル・オブ・エンブリオロジー・アンド・エクスペリメンタル・モルフォロジー、第87巻、27頁、1985年】、本発明のES細胞を分化させて得られる本発明のDNA発現不全細胞は、インビトロにおける本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体の細胞生物学的検討において有用である。

#### 【0069】

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、該動物のmRNA量を公知方法を用いて測定して間接的にその発現量を比較することにより、正常動物と区別することが可能である。

該非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものが用いられる。

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、例えば、前述のようにして作製したターゲッティングベクターをマウス胚幹細胞またはマウス卵細胞に導入し、導入によりターゲッティングベクターの本発明のDNAが不活性化されたDNA配列が遺伝子相同組換えにより、マウス胚幹細胞またはマウス卵細胞の染色体上の本発明のDNAと入れ換わる相同組換えをさせることにより、本発明のDNAをノックアウトさせることができる。

本発明のDNAがノックアウトされた細胞は、本発明のDNA上またはその近傍のDNA配列をプローブとしたサザンハイブリダイゼーション解析またはター

ゲッティングベクター上のDNA配列と、ターゲッティングベクターに使用したマウス由来の本発明のDNA以外の近傍領域のDNA配列とをプライマーとしたPCR法による解析で判定することができる。非ヒト哺乳動物胚幹細胞を用いた場合は、遺伝子相同組換えにより、本発明のDNAが不活性化された細胞株をクローニングし、その細胞を適当な時期、例えば、8細胞期の非ヒト哺乳動物胚または胚盤胞に注入し、作製したキメラ胚を偽妊娠させた該非ヒト哺乳動物の子宮に移植する。作出された動物は正常な本発明のDNA座をもつ細胞と人為的に変異した本発明のDNA座をもつ細胞との両者から構成されるキメラ動物である。

該キメラ動物の生殖細胞の一部が変異した本発明のDNA座をもつ場合、このようなキメラ個体と正常個体を交配することにより得られた個体群より、全ての組織が人為的に変異を加えた本発明のDNA座をもつ細胞で構成された個体を、例えば、コートカラーの判定等により選別することにより得られる。このようにして得られた個体は、通常、本発明のポリペプチドのヘテロ発現不全個体であり、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体のヘテロ発現不全個体同志を交配し、それらの産仔から本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体のホモ発現不全個体を得ることができる。

#### 【0070】

卵細胞を使用する場合は、例えば、卵細胞核内にマイクロインジェクション法でDNA溶液を注入することによりターゲッティングベクターを染色体内に導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を得ることができ、これらのトランスジェニック非ヒト哺乳動物に比べて、遺伝子相同組換えにより本発明のDNA座に変異のあるものを選択することにより得られる。

このようにして本発明のDNAがノックアウトされている個体は、交配により得られた動物個体も該DNAがノックアウトされていることを確認して通常の飼育環境で飼育継代を行なうことができる。

さらに、生殖系列の取得および保持についても常法に従えばよい。すなわち、該不活化DNAの保有する雌雄の動物を交配することにより、該不活化DNAを相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得しうる。得られたホモザイゴート動物は、母親動物に対して、正常個体1、ホモザイゴート複数になるような

状態で飼育することにより効率的に得ることができる。ヘテロザイゴート動物の雌雄を交配することにより、該不活化DNAを有するホモザイゴートおよびヘテロザイゴート動物を繁殖継代する。

本発明のDNAが不活性化された非ヒト哺乳動物胚幹細胞は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を作出する上で、非常に有用である。

また、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体により誘導され得る種々の生物活性を欠失するため、本発明のポリペプチドまたは本発明の受容体の生物活性の不活性化を原因とする疾病のモデルとなり得るので、これらの疾病の原因究明及び治療法の検討に有用である。

#### 【0071】

(8a) 本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニング方法

本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物のスクリーニングに用いることができる。

すなわち、本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に試験化合物を投与し、該動物の変化を観察・測定することを特徴とする、本発明のDNAの欠損や損傷などに起因する疾病に対して治療・予防効果を有する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

該スクリーニング方法において用いられる本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記と同様のものがあげられる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

具体的には、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物を、試験化合物で処理し、無処理の対照動物と比較し、該動物の各器官、組織、疾病の症状などの変化を指標として試験化合物の治療・予防効果を試験することができる。

試験動物を試験化合物で処理する方法としては、例えば、経口投与、静脈注射

などが用いられ、試験動物の症状、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。また、試験化合物の投与量は、投与方法、試験化合物の性質などにあわせて適宜選択することができる。

【0072】

例えば、体重増加抑制薬をスクリーニングする場合、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に糖負荷処置を行ない、糖負荷処置前または処置後に試験化合物を投与し、該動物の血糖値および体重変化などを経時的に測定する。

【0073】

該スクリーニング方法において、試験動物に試験化合物を投与した場合、該試験動物の血糖値が約10%以上、好ましくは約30%以上、より好ましくは約50%以上低下した場合、該試験化合物を上記の疾患に対して治療・予防効果を有する化合物として選択することができる。

該スクリーニング方法を用いて得られる化合物は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のポリペプチドの欠損や損傷などによって引き起こされる疾患に対して治療・予防効果を有するので、該疾患に対する安全で低毒性な治療・予防剤などの医薬として使用することができる。さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸など）や塩基（例、アルカリ金属など）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など）との塩などが用いられる。

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドを含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウ

シ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、該化合物を皮下投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の拒食症患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

【0074】

（8b）本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物をスクリーニング方法

本発明は、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物に、試験化合物を投与し、レポーター遺伝子の発現を検出することを特徴とする本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

上記スクリーニング方法において、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物としては、前記した本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物の中でも、本発明のDNAがレポーター遺伝子を導入することにより不活性化され、該レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの制御下で発現しうるものが用いられる。

試験化合物としては、前記と同様のものがあげられる。

レポーター遺伝子としては、前記と同様のものが用いられ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子（lacZ）、可溶性アルカリフォスファターゼ遺伝子またはルシフェラーゼ遺伝子などが好適である。

本発明のDNAをレポーター遺伝子で置換された本発明のDNA発現不全非ヒ

ト哺乳動物では、レポーター遺伝子が本発明のDNAに対するプロモーターの支配下に存在するので、レポーター遺伝子がコードする物質の発現をトレースすることにより、プロモーターの活性を検出することができる。

例えば、本発明のポリペプチドをコードするDNA領域の一部を大腸菌由来のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子(1acZ)で置換している場合、本来、本発明のポリペプチドの発現する組織で、本発明のポリペプチドの代わりにβ-ガラクトシダーゼが発現する。従って、例えば、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-ガラクトピラノシド(X-gal)のようなβ-ガラクトシダーゼの基質となる試薬を用いて染色することにより、簡便に本発明のポリペプチドの動物生体内における発現状態を観察することができる。具体的には、本発明のポリペプチド欠損マウスまたはその組織切片をグルタルアルデヒドなどで固定し、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)で洗浄後、X-galを含む染色液で、室温または37℃付近で、約30分ないし1時間反応させた後、組織標本を1mMEDTA/PBS溶液で洗浄することによって、β-ガラクトシダーゼ反応を停止させ、呈色を観察すればよい。また、常法に従い、1acZをコードするmRNAを検出してもよい。

上記スクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物から選ばれた化合物であり、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進または阻害する化合物である。

該スクリーニング方法で得られた化合物は塩を形成していてもよく、該化合物の塩としては、生理学的に許容される酸(例、無機酸など)や塩基(例、有機酸など)などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸など)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸など)との塩などが用いられる。

#### 【0075】

本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を促進し、該ポリペプチドの機能を促進することが



できるので、例えば、体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬、摂食抑制薬などとして有用であり、体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤などとして使用することができる。

また、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物またはその塩は、本発明のポリペプチドの発現を阻害し、該ポリペプチドの機能を阻害することができるので、例えば体重増加薬などとして有用であり、体重増加剤などとして使用することができる。

さらに、上記スクリーニングで得られた化合物から誘導される化合物も同様に用いることができる。

#### 【0076】

該スクリーニング方法で得られた化合物またはその塩を含有する医薬は、前記した本発明のポリペプチドまたはその塩を含有する医薬と同様にして製造することができる。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の患者においては、一日につき該化合物を約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を促進する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

一方、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重60kgとして）の患者においては、一

日につき該化合物を約0.1~100mg、好ましくは約1.0~50mg、より好ましくは約1.0~20mg投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の1回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、本発明のDNAに対するプロモーター活性を阻害する化合物を注射剤の形で通常成人（60kgとして）の患者に投与する場合、一日につき該化合物を約0.01~30mg程度、好ましくは約0.1~20mg程度、より好ましくは約0.1~10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kg当りに換算した量を投与することができる。

このように、本発明のDNA発現不全非ヒト哺乳動物は、本発明のDNAに対するプロモーターの活性を促進または阻害する化合物またはその塩をスクリーニングする上で極めて有用であり、本発明のDNA発現不全に起因する各種疾患の原因究明または予防・治療薬の開発に大きく貢献することができる。

また、本発明のポリペプチドのプロモーター領域を含有するDNAを使って、その下流に種々のタンパクをコードする遺伝子を連結し、これを動物の卵細胞に注入していわゆるトランスジェニック動物（遺伝子移入動物）を作成すれば、特異的にそのポリペプチドを合成させ、その生体での作用を検討することも可能となる。さらに上記プロモーター部分に適当なレポーター遺伝子を結合させ、これが発現するような細胞株を樹立すれば、本発明のポリペプチドそのものの体内での産生能力を特異的に促進もしくは抑制する作用を持つ低分子化合物の探索系として使用できる。

#### 【0077】

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

DNA	: デオキシリボ核酸
cDNA	: 相補的デオキシリボ核酸
A	: アデニン

T	: チミン
G	: グアニン
C	: シトシン
I	: イノシン
R	: アデニン (A) またはグアニン (G)
Y	: チミン (T) またはシトシン (C)
M	: アデニン (A) またはシトシン (C)
K	: グアニン (G) またはチミン (T)
S	: グアニン (G) またはシトシン (C)
W	: アデニン (A) またはチミン (T)
B	: グアニン (G)、グアニン (G) またはチミン (T)
D	: アデニン (A)、グアニン (G) またはチミン (T)
V	: アデニン (A)、グアニン (G) またはシトシン (C)
N	: アデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C) もしくはチミン (T) または不明もしくは他の塩基
RNA	: リボ核酸
mRNA	: メッセンジャーリボ核酸
dATP	: デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	: デオキシチミジン三リン酸
dGTP	: デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	: デオキシシチジン三リン酸
ATP	: アデノシン三リン酸
EDTA	: エチレンジアミン四酢酸
SDS	: ドデシル硫酸ナトリウム
BHA	: ベンズヒドリルアミン
pMBHA	: p-メチルベンズヒドリルアミン
Tos	: p-トルエンスルフォニル
Bzl	: ベンジル
Bom	: ベンジルオキシメチル

Boc	: t-ブチルオキシカルボニル
DCM	: ジクロロメタン
HOBt	: 1-ヒドロキシベンズトリアゾール
DCC	: N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
TFA	: トリフルオロ酢酸
DIEA	: ジイソプロピルエチルアミン
Gly又はG	: グリシン
Ala又はA	: アラニン
Val又はV	: バリン
Leu又はL	: ロイシン
Ile又はI	: イソロイシン
Ser又はS	: セリン
Thr又はT	: スレオニン
Cys又はC	: システイン
Met又はM	: メチオニン
Glu又はE	: グルタミン酸
Asp又はD	: アスパラギン酸
Lys又はK	: リジン
Arg又はR	: アルギニン
His又はH	: ヒスチジン
Phe又はF	: フェニルアラニン
Tyr又はY	: チロシン
Trp又はW	: トリプトファン
Pro又はP	: プロリン
Asn又はN	: アスパラギン
Gln又はQ	: グルタミン
pGlu	: ピログルタミン酸
Tyr (I)	: 3-ヨードチロシン
DMF	: N,N-ジメチルホルムアミド

Fmoc : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル  
Trt : トリチル  
Pbf : 2,2,4,6,7-ペンタメチルジヒドロベンゾフラン-5-スルホ  
ニル  
Clt : 2-クロロトリチル  
Bu<sup>t</sup> : t-ブチル  
Met (O) : メチオニンスルフォキシド

【0078】

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

【配列番号：1】

ヒトGPR8蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA  
Aを示す。

【配列番号：2】

ヒトGPR8蛋白質をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNA  
Aを示す。

【配列番号：3】

5'側に制限酵素ClaIの認識する塩基配列が付加され、また3'側に制限酵  
素SpeIの認識する塩基配列が付加されたヒトGPR8蛋白質cDNAの全塩  
基配列を示す。

【配列番号：4】

ヒトGPR8蛋白の全アミノ酸配列を示す。

【配列番号：5】

GPR8発現CHO細胞株の各クローンにおけるGPR8受容体蛋白質mRNA  
の発現量を測定するために使用したriboprobeの配列を示す。

【配列番号：6】

ブタ視床下部から精製されたGPR8に対するリガンドペプチドのアミノ末端ア  
ミノ酸配列解析の結果から得られたアミノ酸配列を示す。

【配列番号：7】

相補鎖がGPR8リガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコード

していると推定されるEST配列（アクセッション番号：AW007531）を示す。

〔配列番号：8〕

相補鎖がGPR8リガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードしていると推定されるEST配列（アクセッション番号：AI500303）を示す。

〔配列番号：9〕

相補鎖がGPR8リガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードしていると推定されるEST配列（アクセッション番号：AI990964）を示す。

〔配列番号：10〕

相補鎖がGPR8リガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードしていると推定されるEST配列（アクセッション番号：AA744804）を示す。

〔配列番号：11〕

GPR8リガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白の一部をコードしていると推定されるEST配列（アクセッション番号：H31598）を示す。

〔配列番号：12〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：13〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：14〕

ヒト脳由来cDNAから増幅されたGPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードするDNA配列を示す。

〔配列番号：15〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：16〕

配列番号：15から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：17〕

配列番号：15から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：18〕

配列番号：16で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：19〕

配列番号：17で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：20〕

後述の参考例14で合成されたヒトGPRリガンド(1-29)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：21〕

後述の参考例15で合成されたヒトGPRリガンド(1-28)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：22〕

後述の参考例16で合成されたヒトGPRリガンド(1-27)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：23〕

後述の参考例17で合成されたヒトGPRリガンド(1-26)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：24〕

後述の参考例18で合成されたヒトGPRリガンド(1-25)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：25〕

後述の参考例19で合成されたヒトGPRリガンド(1-24)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：26〕

配列番号：20で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

配列番号：21で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：28〕

配列番号：22で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：29〕

配列番号：23で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：30〕

配列番号：24で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：31〕

配列番号：25で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：32〕

配列番号：4で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：33〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする cDNAの5' 上流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：34〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする cDNAの5' 上流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：35〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする cDNAの5' 上流側DNA配列を示す。

〔配列番号：36〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする cDNAの3' 下流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：37〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする cDNAの3' 下流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：38〕



GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 3' 下流側 DNA 配列を示す。

〔配列番号：39〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：40〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：41〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の配列を示す。

〔配列番号：42〕

GPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：43〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：44〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：45〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流側 DNA 配列を示す。

〔配列番号：46〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：47〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：48〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流側 DNA 配列を示す。

〔配列番号：49〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 3' 下流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：50〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 3' 下流側配列を得るのに使用した合成 DNA を示す。

【0079】

〔配列番号：51〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の 3' 下流側 DNA 配列を示す。

〔配列番号：52〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：53〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA を得るのに使用した合成 DNA を示す。

〔配列番号：54〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白をコードする cDNA の配列を示す。

〔配列番号：55〕

GPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログの前駆体蛋白のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：56〕

配列番号：55から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：57〕

配列番号：55から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのブタホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：58〕

配列番号：56で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：59〕

配列番号：57で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：60〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白の一部をコードするcDNAを得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：61〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白の一部をコードするcDNAを得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：62〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白の一部をコードするcDNAの配列を示す。

〔配列番号：63〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：64〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：65〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側DNA配列を示す。

〔配列番号：66〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：67〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードする

cDNAの3' 下流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：68〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードする

cDNAの3' 下流側DNA配列を示す。

〔配列番号：69〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードする

cDNAを得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：70〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードする

cDNAを得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：71〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白をコードする

cDNAの配列を示す。

〔配列番号：72〕

GPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログの前駆体蛋白のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：73〕

配列番号：72から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：74〕

配列番号：72から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのラットホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：75〕

配列番号：73で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：76〕

配列番号：74で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：77〕

ヒトGPR7発現CHO細胞のGPR7遺伝子発現量を測定するのにプローブとして用いた合成DNAの配列を示す。

〔配列番号：78〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白の一部をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：79〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白の一部をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：80〕

マウス精巢由来cDNAから増幅されたGPR8に対するリガンドペプチドのヒトホモログの前駆体蛋白の一部をコードするDNA配列を示す。

〔配列番号：81〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：82〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：83〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流側DNA配列を示す。

〔配列番号：84〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：85〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流側配列を得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：86〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流側DNA配列を示す。

〔配列番号：87〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードする

cDNAを得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：88〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードする

cDNAを得るのに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：89〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白をコードする

cDNAの配列を示す。

〔配列番号：90〕

GPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログの前駆体蛋白のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：91〕

配列番号：90から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：92〕

配列番号：90から推定されたGPR8に対するリガンドペプチドのマウスホモログのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：93〕

配列番号：91で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：94〕

配列番号：92で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：95〕

後述の参考例44で合成されたヒトGPR8リガンド(1-23)酸化体のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：96〕

後述の参考例45で合成されたヒトGPR8リガンド(1-22)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：97〕

後述の参考例46で合成されたヒトGPR8リガンド(1-21)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：98〕

後述の参考例47で合成されたヒトGPR8リガンド(1-20)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：99〕

後述の参考例48で合成されたヒトGPR8リガンド(1-19)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：100〕

後述の参考例49で合成されたヒトGPR8リガンド(1-18)のアミノ酸配列を示す。

〔0080〕

〔配列番号：101〕

後述の参考例50で合成されたヒトGPR8リガンド(1-17)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：102〕

後述の参考例51で合成されたヒトGPR8リガンド(1-16)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：103〕

後述の参考例54で合成されたGPR8リガンド(1-23)酸化体のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：104〕

後述の参考例55で合成されたラットあるいはマウスGPR8リガンド(1-23)酸化体のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：105〕

後述の参考例12で合成されたFmoc化ヒトGPR8リガンド(1-23)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：106〕

後述の参考例56で合成された $[N^{\alpha}\text{-Acetyl-Trp}^1]$ -ヒトGPR8リガンド(1-23)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：107〕

後述の参考例57で合成されたヒトGPR8リガンド(2-23)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：108〕

後述の参考例58で合成されたヒトGPR8リガンド(4-23)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：109〕

後述の参考例59で合成されたヒトGPR8リガンド(9-23)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：110〕

後述の参考例60で合成されたヒトGPR8リガンド(15-23)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：111〕

後述の参考例61で合成された[N-Acetyl-Tyr<sup>2</sup>]-ヒトGPR8リガンド(2-23)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：112〕

後述の参考例62で合成された[D-Trp<sup>1</sup>]-ヒトGPR8リガンド(1-23)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：113〕

後述の参考例63で合成された[N-3-Indolepropanoyl-Tyr<sup>2</sup>]-ヒトGPR8リガンド(2-23)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：114〕

配列番号：96で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：115〕

配列番号：97で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：116〕

配列番号：98で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：117〕

配列番号：99で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：118〕



配列番号：100で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：119〕

配列番号：101で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：120〕

配列番号：102で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：121〕

配列番号：107で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：122〕

配列番号：108で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：123〕

配列番号：109で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：124〕

配列番号：110で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：125〕

配列番号：6で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

〔配列番号：126〕

本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR26の

アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：127〕

本発明のラット由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR26を

コードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：128〕

以下の参考例67におけるPCR反応で使用したプライマー1の塩基配列を示す

〔配列番号：129〕

以下の参考例67におけるPCR反応で使用したプライマー2の塩基配列を示す

〔配列番号：130〕

以下の参考例68におけるTGR26発現CHO細胞のTGR26レセプター遺

伝子発現量を測定するのに使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：131〕

以下の参考例68におけるTGR26発現CHO細胞のTGR26レセプター遺伝子発現量を測定するのに使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：132〕

以下の参考例75におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：133〕

以下の参考例75におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：134〕

以下の参考例75で得られたマウスTGR26をコードするDNAの5'上流端部分の塩基配列を示す。

〔配列番号：135〕

以下の参考例24におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：136〕

以下の参考例24におけるPCR反応で使用したプライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：137〕

以下の参考例24で得られたマウスTGR26をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：138〕

本発明のマウス由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR26のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：139〕

本発明のマウス由来新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質TGR26をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：140〕

以下の参考例68におけるTGR26発現CHO細胞のTGR26レセプター遺伝子発現量を測定するのに使用したプローブの塩基配列を示す。

〔配列番号：141〕

ヒトGPR7をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示

す。

〔配列番号：142〕

ヒトGPR7をコードするcDNAのスクリーニングに使用した合成DNAを示す。

〔配列番号：143〕

5'側に制限酵素ClaIの認識する塩基配列が付加され、また3'側に制限酵素SpeIの認識する塩基配列が付加されたヒトGPR7蛋白質cDNAの全塩基配列を示す。

〔配列番号：144〕

ヒトGPR7の全アミノ酸配列を示す。

〔配列番号：145〕

標準ヒトGPR7DNAを増幅するのにプライマーとして使用したDNA塩基配列を示す。

〔配列番号：146〕

標準ヒトGPR7DNAを増幅するのにプライマーとして使用したDNA塩基配列を示す。

〔配列番号：147〕

ヒトGPR7発現CHO細胞のGPR7遺伝子発現量を測定するのにプライマーとして用いた合成DNAの配列を示す。

〔配列番号：148〕

ヒトGPR7発現CHO細胞のGPR7遺伝子発現量を測定するのにプライマーとして用いた合成DNAの配列を示す。

〔配列番号：149〕

[Phe<sup>2</sup>] ヒトGPR8リガンド(1-20)のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：150〕

配列番号：149で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す。

【0081】

後述の参考例3で得られた形質転換体、Escherichia coli DH5 $\alpha$ /pAKK0-GPR8は、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85、財団法人発酵研究所(IFO

)に2001年2月27日から寄託番号IFO 16564として、茨城県つくば市東1-1-1 中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM BP-7540として、それぞれ寄託されている。

後述の参考例28で得られた形質転換体、Escherichia coli TOP10/pCR2.1-TOPO Human GPR8 Ligand Precursorは、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85、財団法人発酵研究所(IFO)に2001年2月27日から寄託番号IFO 16568として、茨城県つくば市東1-1-1 中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM BP-7544として、それぞれ寄託されている。

後述の参考例32で得られた形質転換体、Escherichia coli TOP10/pCR2.1-TOPO Porcine GPR8 Ligand Precursorは、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85、財団法人発酵研究所(IFO)に2001年2月27日から寄託番号IFO 16565として、茨城県つくば市東1-1-1 中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM BP-7541として、それぞれ寄託されている。

後述の参考例36で得られた形質転換体、Escherichia coli TOP10/pCR2.1-TOPO Rat GPR8 Ligand Precursorは、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85、財団法人発酵研究所(IFO)に2001年2月27日から寄託番号IFO 16567、茨城県つくば市東1-1-1 中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM BP-7543として、それぞれ寄託されている。

後述の参考例41で得られた形質転換体、Escherichia coli TOP10/pCR2.1-TOPO Mouse GPR8 Ligand Precursorは、大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85、財団法人発酵研究所(IFO)に2001年2月27日から寄託番号IFO 16566として、茨城県つくば市東1-1-1 中央第6、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに2001年4月11日から受託番号FERM BP-7542として、それぞれ寄託されている。

後述の参考例67で得られた形質転換体 大腸菌(Escherichia coli) DH1

OB/pAK-rGPR7は、2000年10月31日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号（郵便番号532-8686）、財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16496として、2000年11月13日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（旧通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（NIBH））に受託番号FERM BP-7365としてそれぞれ寄託されている。

後述の参考例24で得られた形質転換体 大腸菌（*Escherichia coli*）TOP10/pCR2.1-TOPO Mouse GPR7は、2001年9月20日から大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号（郵便番号532-8686）、財団法人・発酵研究所（IFO）に受託番号IFO 16704として、2001年10月15日から茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6（郵便番号305-8566）、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに受託番号FERM BP-7775としてそれぞれ寄託されている。

【0082】

【参考例】

以下に参考例および実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0083】

参考例1 ヒト脳由来cDNAを用いたPCR法によるヒトGPR8 cDNAの増幅

ヒト脳由来poly (A)<sup>+</sup>RNA（クローンテック）を鋳型として、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行なった。逆転写は、タカラRNAPCR ver 2.1キット試薬を使用した。次にこの逆転写生成物を鋳型として用い、配列番号：1および配列番号：2で表される合成プライマーを用いてPCR法による増幅を行なった。合成プライマーは受容体蛋白に翻訳される領域の遺伝子が増幅されるように構築したが、その際に遺伝子の5'側に制限酵素C1a Iの認識する塩基配列が付加され、3'側に制限酵素Spe Iの認識する塩基配列が付加されるように、5'側および3'側にそれぞれの制限酵素の認識配列を付加した。反応液の組成は、c

DNA 鋳型  $5\mu\text{l}$ 、合成 DNA プライマー各  $0.4\mu\text{M}$ 、 $0.8\text{mM}$  dNTPs、pfu ポリメラーゼ (ストラタジーン)  $0.5\mu\text{l}$  および酵素に付属のバッファーで、総反応量は  $50\mu\text{l}$  とした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、 $94^\circ\text{C} \cdot 60$  秒の加熱の後、 $94^\circ\text{C} \cdot 60$  秒、 $65^\circ\text{C} \cdot 60$  秒、 $72^\circ\text{C} \cdot 150$  秒のサイクルを 35 回繰り返した。増幅産物の確認は、 $0.8\%$  アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色によって行なった。

## 【0084】

参考例 2 PCR 産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入 cDNA 部分の塩基配列の解読による増幅 cDNA 配列の確認

参考例 1 で行なった PCR 反応液を  $0.8\%$  の低融点アガロースゲル電気泳動により分離し、バンドの部分をかみそりで切り出した後、細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿の操作を行なって DNA を回収した。PCR-Script<sup>TM</sup> Amp SK(+) クローニングキット (ストラタジーン) の処方に従い、回収した DNA をプラスミドベクター pCR-Script Amp SK(+) へサブクローニングした。これをエシェリヒアコリ (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  competent cell (東洋紡) に導入して形質転換した後、cDNA 挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTG および X-gal を含む LB 寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体 *E. coli* DH5 $\alpha$  /GPR8 を得た。個々のクローンをアンピシリンを含む LB 培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミド DNA を調製した。調製した DNA の一部に対して制限酵素 ClaI および SpeI による切断を行ない、挿入されている受容体 cDNA 断片の大きさを確認した。塩基配列の決定のための反応は Dye Deoxy Terminator Cycle Sequence Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した (配列番号: 3)。ヒト GPR8 受容体蛋白質 cDNA の全塩基配列が配列番号: 3 に、およびそれから翻訳されるヒト GPR8 受容体蛋白質の全アミノ酸配列が配列番号: 4 に示されている。

## 【0085】

参考例 3 GPR8 発現 CHO 細胞の作製

参考例 2 で配列が確認されたヒト脳由来の GPR 8 の全長アミノ酸配列をコードし 5' 側に Cla I 認識配列を付加し、また 3' 側に Spe I 認識配列を付加した遺伝子が導入されたプラスミドによって形質転換された E. coli のクローンから Plasmid Midi Kit (キアゲン) を用いてプラスミド DNA を調製し、これを制限酵素 Cla I および Spe I で消化してインサート DNA を切り出した。インサート DNA は電気泳動後、アガロースゲルからカミソリで切り出し、次に細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿の操作により回収された。このインサート DNA を Cla I および Spe I で切断した動物細胞発現用ベクタープラスミド pAKKO-111H (S. Hinuma et al., Biochim. Biophys. Acta, 1219 巻, 251-259 頁, 1994 年, 記載の pAKKO1.11H と同一のベクタープラスミド) に加え、T4 リガーゼ (宝酒造) を用いてライゲーションを行ない、蛋白発現用プラスミド pAKKO-GPR8 を構築した。このプラスミド pAKKO-GPR8 で形質転換した大腸菌を DH5  $\alpha$  /pAKKO-GPR8 (Escherichia coli DH5  $\alpha$  /pAKKO-GPR8) と命名した。

pAKKO-GPR8 で形質転換した E. coli DH5  $\alpha$  (東洋紡) を培養後、Plasmid Midi Kit (キアゲン) を用いて pAKKO-GPR8 プラスミド DNA を調製した。これを CellPhectTransfection Kit (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて、添付のプロトコールに従って CHO dhfr<sup>-</sup>細胞に導入した。4.5  $\mu$ g の DNA をリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24 時間前に  $5 \times 10^5$  または  $1 \times 10^6$  個の CHO dhfr<sup>-</sup>細胞を播種した直径 6cm シャーレに添加した。10% ウシ胎児血清を含む MEM  $\alpha$  培地で 1 日間培養した後、継代し、選択培地である 10% 透析ウシ胎児血清を含む核酸不含 MEM  $\alpha$  培地で培養した。選択培地中に増殖してくる GPR 8 発現 CHO 細胞である形質転換細胞のコロニー 47 クローンを選択した。

【0086】

参考例 4 全長ヒト GPR 8 蛋白質 mRNA の発現量の高い CHO/GPR 8 細胞株の選択

参考例 3 で樹立された CHO/GPR 8 細胞株 47 クローン的全長 GPR 8 蛋白質 mRNA の発現量を Cytostar T Plate (アマシャムファルマシアバイオテック) を用い、添付のプロトコールに従って以下のように測定した。CHO/GPR

8細胞株の各クローンをCytostarT Plateに1well当たり $2.5 \times 10^4$ 個ずつ播種して24時間培養した後、10%ホルマリンによって細胞を固定した。各wellに0.25% Triton X-100を添加して細胞の透過性をあげた後、 $^{35}\text{S}$ ラベルした配列番号: 5のriboprobeを加えてハイブリダイズさせた。20  $\mu\text{g/ml}$ のRNaseAを各wellに加えて遊離のriboprobeを消化し、プレートをよく洗浄した後、ハイブリダイズしたriboprobeの放射活性をTopcounterで測定した。放射活性の高い細胞株は、mRNA発現量が高い。mRNA発現量の高い3クローン(#17,41および46)を以下に実験に用いたが、特にクローン番号17を用いた。

【0087】

参考例5 GPR8発現CHO細胞を用いた細胞内cAMP産生量の測定

参考例4で作製したCHO/GPR8細胞およびmock CHO細胞を24穴プレートに $5 \times 10^4$  cell/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mMHEPSを含むハンクスバッファー(pH 7.4)で洗浄した(以下、0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチンと0.05% BSAと20mMHEPSを含むハンクスバッファー(pH7.4)を、反応用バッファーと呼ぶ)。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温した。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、試料と2  $\mu\text{M}$  フォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを細胞に加え、37℃で24分間反応させた。100  $\mu\text{l}$ の20%過塩素酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は、cAMP MPEIAキット(アマシャムファルマシアバイオテック)を用いて測定した。

【0088】

参考例6 GPR8発現CHO細胞の膜面分を用いたGTP  $\gamma$  S結合活性の測定

GPR8発現CHO細胞膜面分に対する $^{35}\text{S}$ -Guanosine 5'-( $\gamma$ -thio) triphosphateの結合促進活性を以下の方法により測定した。最初に膜面分の調整法を記載する。1  $\times 10^8$ 個のCHO/GPR8細胞に10mlのホモジネートバッファー(10mMNaHCO<sub>3</sub>, 5mM EDTA, 0.5mM PMSF, 1  $\mu\text{g/ml}$  pepstatin, 4  $\mu\text{g/ml}$  E64, 20  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin)添加し、ポリトロン(12,000rpm, 1分間)を用いて破碎した。細胞破碎液を遠心(1,000 g, 15分間)して上清を得た。次にこの上清を超遠心



分離 (Beckman type 30ローター、30,000rpm、1時間) し、得られた沈殿物を GPR8 発現 CHO 細胞膜面分とした。

GTP $\gamma$ S 結合活性の測定は以下の通りである。GPR8 発現 CHO 細胞膜面分を膜希釈緩衝液 (50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 150mM NaCl, 1  $\mu$ M GDP) で希釈して、蛋白質濃度 30mg/ml のアッセイ用細胞膜面分溶液を調製した。アッセイ用膜面分溶液 200  $\mu$ l に、51.5nM 濃度の [<sup>35</sup>S]-Guanosine 5'-( $\gamma$ -thio)triphosphate (NEN 社) を 2  $\mu$ l と試料を添加し、この混合液を 25℃ で一時間保温した。混合液をフィルター濾過し、さらにフィルターを洗浄用バッファー (50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 0.1% BSA) 1.5ml で 2 回洗浄した後、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

#### 【0089】

参考例 7 ブタ視床下部抽出物に含まれ、CHO/GPR8 細胞株に対して特異的に cAMP 産生抑制および GTP $\gamma$ S 結合促進を示す活性の検出

ブタ視床下部抽出物の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) フラクシオンを以下に述べる方法で調製した。東京芝浦臓器 (株) より購入した、処理当日に屠殺して摘出後は氷冷保存したブタ視床下部 500 g (30 頭分) を細かく切断し、直ぐに沸騰した蒸留水 2.0 l に投じて 10 分間煮沸した。煮沸後、直ちに氷冷し、10 ml の酢酸を加えて終濃度 1.0M とし、ポリトロン (20,000 rpm、6 分間) を用いて破碎した。破碎液を遠心 (8,000 rpm、30 分) して上清を取り、沈殿には 1.0 M 酢酸 2.0 l を加えて再度ポリトロンによって破碎し、一晚攪拌した後、遠心 (8,000rpm、30 分) して上清を得た。上清に 2 倍量の冷アセトンを 4℃ でゆっくり滴下した後、1 回目の遠心によって得た上清については一晚攪拌し、2 回目の遠心によって得た上清については 4 時間攪拌した。アセトンを加えた抽出液は遠心 (8,000rpm、30 分) して沈殿を除き、得られた上清からエバポレーターによって減圧下にアセトンを溜去した。アセトンを除いた抽出液に等量のジエチルエーテルを加え、分液ロートを使って脂質を含むエーテル層を分離して水層を回収した。エーテル脱脂した抽出液はエバポレーターによって減圧下に濃縮してエーテルを完全に除去した。濃縮液をガラス繊維濾紙 (アドバンテック、DP70 (90 mm  $\phi$ )) で

濾過し、濾液をガラス製カラム (30  $\phi$  x 240 mm) に充填したC18 (ワイエムシー、YMCgel ODS-AM 120-S50) カラムに添加した。カラムを1.0 M酢酸400mlで洗浄後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む60%アセトニトリル500 mlで溶出した。溶出液を減圧下に濃縮して溶媒を溜去した後、濃縮液を凍結乾燥した。凍結乾燥品約0.5gを30 mlの0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリルに溶解し、10 mlずつをC18カラム (トーソー、TSKgel ODS-80TS (21.5  $\phi$  x 300 mm)) を用いた10%から60%の0.1%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルの濃度勾配溶出法によるHPLCにかけた。HPLCは3回行なった。溶出液は60分画に分取し、3回分の溶出液をまとめた。各分画を減圧下に濃縮・乾固し、残渣を0.5mlのジメチルスルフォキシド (DMSO) で溶解した。

上記によって得られたHPLCフラクションのDMSO溶液を参考例5に示した方法によってCHO/GPR8細胞に投与し、細胞内cAMP産生量の測定を行なった結果、分画番号30に顕著なcAMP産生抑制活性が認められた。また同様な試料についてGPR8発現CHO細胞用いてGTP $\gamma$ S結合促進活性を調べたところ、やはり分画番号30付近に顕著な活性が確認された。これらの活性は他の受容体発現細胞では認められなかったことからブタ視床下部抽出物にGPR8特異的なリガンド活性物質が存在することが示された。

#### 【0090】

参考例8 ブタ視床下部抽出物中のGPR8発現CHO細胞に対して特異的に細胞内cAMP産生抑制活性を示す活性物質のプロナーゼによる失活

参考例7でGPR8発現CHO細胞に対して細胞内cAMP産生抑制活性を示したHPLC分画30を蛋白分解酵素であるプロナーゼ (Sigma, protease Type XIV (P5147)) で処理し、活性物質が蛋白性であるかを調べた。

上記視床下部抽出物HPLC分画 (#30) 2  $\mu$ lを0.2 M酢酸アンモニウム200  $\mu$ lに加え、これにプロナーゼ3  $\mu$ gを添加して37℃で2時間インキュベートした後、沸騰水中で10分間加熱してプロナーゼを失活させた。これにBSA 0.05mgおよびCHAPS0.05 mgを含む蒸留水2 mlを加えてから凍結乾燥した。プロナーゼそのものあるいは加熱および凍結乾燥の影響を調べるため、プロナーゼのみ、HPLC分画のみおよびプロナーゼのみを加熱処理した後にHPLC分画を加えたものに

についても同様に処理して凍結乾燥した。凍結乾燥した各試料を参考例5に示す方法によってGPR8発現CHO細胞に添加して細胞内cAMP産生抑制活性を測定した。ブタ視床下部抽出物中のGPR8発現CHO細胞に対する細胞内cAMP産生抑制活性を示す活性物質はプロナーゼによって完全に失活したことからこの物質が蛋白もしくはペプチドであることが示された。

## 【0091】

参考例9 ブタ視床下部からのGPR8発現CHO細胞膜画分に対して特異的にGTP $\gamma$ S結合促進活性を示す活性物質の精製

GPR8に特異的なリガンド活性を示す物質をGPR8発現CHO細胞膜画分に対するGTP $\gamma$ S結合促進活性を指標としてブタ視床下部から精製した代表例を以下に具体的に述べる。参考例7に述べた方法と全く同一の方法により、ブタ視床下部500g(30頭分)を1.0M酢酸で抽出し、アセトン沈殿およびエーテル脱脂をした後、C18(ワイエムシー、YMCgel ODS-AM120-S50)カラムに吸着させ、0.1%トリフルオロ酢酸を含む60%アセトニトリルで溶出した。溶出液を濃縮し、凍結乾燥した後、C18カラム(トーソー、TSKgel ODS-80TS (21.5 $\phi$  x 300 mm))を用いたHPLCによって活性分画を得た。活性は分画番号30に回収された。これを以下の方法によってさらに精製した。

この分画を10%アセトニトリルを含む10 mMギ酸アンモニウム10 mlに溶解し、陽イオン交換カラム(トーソー、TSKgel SP-5PW (20mm $\phi$  x150 mm))に添加した後、10%アセトニトリルを含む10 mMから2.0 Mのギ酸アンモニウムの濃度勾配によってカラムを溶出した。活性はギ酸アンモニウム0.8M付近に回収された。活性分画を凍結乾燥し、0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリル1.0 mlに溶解し、CNカラム(野村化学、DevelosilCN-UG-5 (4.6 mm $\phi$  x 250 mm))に添加した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む21%から26%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出した。活性はアセトニトリル22.1%付近に出現した。活性分画を凍結乾燥し、0.1mlのDMSOで溶解し、さらに0.4 mlの0.1%トリフルオロ酢酸を含む10%アセトニトリルを加えてODSカラム(和光純薬、Wakosil-IIIC18HG (2.0 mm $\phi$  x 150 mm))に添加した後、0.1%トリフルオロ酢酸を含む22.5%から32.5%のアセトニトリルの濃度勾配によって溶出した。活性はアセトニトリル26.5%付近

に単一ピークとして出現した（図1）。

【0092】

参考例10 プタ視床下部から精製されたGPR8発現CHO細胞膜画分に対して特異的にGTP $\gamma$ S結合促進活性を示す活性物質のアミノ末端アミノ酸配列の解析およびGPR8リガンドのヒトおよびラットホモログペプチドの前駆体蛋白の一部をコードしていると推定されるEST配列

参考例9で精製されたGPR8発現CHO細胞膜画分に対して特異的にGTP $\gamma$ S結合促進活性を示す活性物質のアミノ末端アミノ酸配列解析を行なった。本活性物質は参考例8に示すように蛋白またはペプチドであることが推定されていたので、活性ピークを含む溶出液を用いてパーキンエルマー社Proclise 494 Protein Sequencerによってアミノ末端アミノ酸配列分析を行なった。その結果、アミノ末端から17残基までに配列番号：6に示す配列が得られた。この配列はリガンドペプチドの一部であると考えられた。

【0093】

この配列に基づいて遺伝子データベースの検索を行なったところ、そのものもしくはその相補鎖がこのペプチドの前駆体蛋白の一部をコードしていると推定される幾つかのEST (Expressed Sequence Tag) 配列が見出された。それらのアクセッション番号、cDNAの由来、配列の長さおよび配列番号は次の通りである。AW007531(anaplastic oligodendroglioma、438 base、配列番号：7)、AI500303 (anaplastic oligodendroglioma、264 base、配列番号：8)、AI990964 (colonic mucosa from patient of Crohn's disease、424 base、配列番号：9)、AA744804 (germinal center B cell、375 base、配列番号：10)、H31598(PC12 cells、260 base、配列番号：11)。初めの4つはヒト由来であり、最後の1つはラット由来である。これらのESTのDNA配列はプタ視床下部より単離した活性ペプチドの配列に相当するアミノ酸配列をコードする領域では極めてよく一致しており、また翻訳されたアミノ酸配列はプタ視床下部より単離され明らかとなったペプチドの配列とは5残基目のThrがValであること以外はほぼ一致した。以上からこれらのESTはGPR8のリガンドペプチドのヒトおよびラットホモログの前駆体蛋白の一部をコードしているものと推定した。

## 【0094】

参考例11 GPR8リガンドペプチド前駆体の一部をコードするヒトcDNAの増幅と増幅cDNA配列の解読

参考例10に述べたGPR8リガンドペプチドの前駆体蛋白の一部をコードすると推定されたEST配列に基づいてプライマーを設計し、ヒト脳由来cDNAよりPCRによってGPR8リガンドペプチド前駆体の一部をコードするcDNAを増幅した。

ヒト脳由来poly (A) +RNA (クローンテック) を鋳型として、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行なった。逆転写反応には、RNase H活性を欠失させたMMLV由来の逆転写酵素であるReverTraAce (東洋紡) を使用した。続いて参考例10に述べたEST配列に基づいて設計した配列番号: 12および配列番号: 13の合成DNAプライマーを用いてPCR法による増幅を行なった。反応液の組成は、cDNA鋳型2 $\mu$ l、合成DNAプライマー各0.5 $\mu$ M、1.6mM dNTPs、LA Taq (宝酒造) 0.2 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファーで、総反応量は20 $\mu$ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー (PE Biosystems) を使い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・45秒のサイクルを4回、96 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・45秒のサイクルを4回、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・45秒のサイクルを4回、96 $^{\circ}$ C・30秒、64 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・45秒のサイクルを5回、96 $^{\circ}$ C・30秒、60 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・45秒のサイクルを20回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅産物の確認は、3%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色によって行なった。

PCR反応液を3%の低融点アガロースゲル電気泳動により分離し、バンドの部分をかみそりで切り出した後、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてDNAを回収した。TOP0 TAクローニングキット (インビトロゲン) の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR2.1-TOP0へサブクローニングした。これをEscherichia coli TOP10 (インビトロゲン) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で

一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調製した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxyTerminator CycleSequence Kit (PE Biosystems)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号: 14に示すDNA配列を得た。このこの配列から翻訳されるGPR8リガンドペプチド前駆体蛋白の一部(配列番号: 15)には予想どおりブタ視床下部より単離されて配列が明らかになった活性ペプチドに相当するペプチド配列が存在した。さらに、そのC末側には通常の生理活性ペプチドが切り出されと考えられるArg-Argの配列(Seidah, N. G. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 839巻、9-24頁、1998年)が2ヶ所存在した。このことから、GPR8のリガンドペプチドのヒトホモログのアミノ酸配列は配列番号: 16および17のいずれかもしくは両方であると推定された。

## 【0095】

参考例12 Fmoc化ヒトGPR8 ligand (1-23): Fmoc-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 105) およびヒトGPR8ligand (1-23): Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 16) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Leu を導入したFmoc-Leu-O-Cltresin(0.76mmol/g) 0.25mmol を出発原料とし、ペプチド合成機AB01433A を用い Fmoc/ DCC/ HOBt法により、Fmoc-Gly, Fmoc-Met, Fmoc-Leu, Fmoc-Leu, Fmoc-Gly, Fmoc-Ala, Fmoc-Ala, Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Gly, Fmoc-Val, Fmoc-Thr(Bu<sup>t</sup>), Fmoc-His(Trt), Fmoc-Tyr(Bu<sup>t</sup>), Fmoc-Arg(Pbf), Fmoc-Pro, Fmoc-Ser(Bu<sup>t</sup>), Fmoc-Ala, Fmoc-Val, Fmoc-His(Trt), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Tyr(Bu<sup>t</sup>), Fmoc-Trp(Boc) の順に縮合を行い、Fmoc-Trp(Boc)-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-Lys(Boc)-His(Trt)-Val-Ala-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Pro-Arg(Pbf)-Tyr(Bu<sup>t</sup>)-His(Trt)-Thr(Bu<sup>t</sup>)-Val-Gly-Arg(Pbf)-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-O-Cltresin 830 mg を得た。この樹脂150mgに TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane/ ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) 5 ml を加え、室温にて 2時間振盪した後樹脂をろ去し、溶媒を濃縮後エーテルを加え、粗Fmoc-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-P

ro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leuを沈殿として得た。これを YMC D-ODS-5-ST S-5 120A カラム(20 x 150mm)を用いた分取HPLCで、A液: 0.1%TFA-水、B液:0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B: 72/28~52/48への直線型濃度勾配溶出(60分)を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末9.7mgを得た。

【0096】

質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 2805.7 (計算値2805.4)

HPLC溶出時間 25.1 分

溶出条件

カラム Wakosil-II5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液:0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 10/0 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分 得られたFmoc-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu 5 mg に 20% diethylamine / DMF 1 mL を加え室温にて2 時間攪拌した。溶媒を留去後 YMC D-ODS-5-ST S-5 120A カラム(20 x 150mm)を用いた分取HPLCで、A液: 0.1%TFA-水、B液:0.1%TFA含有アセトニトリルによるA/B: 74/26~64/36への直線型濃度勾配溶出(60分)を行い、目的物を含む分画を集め凍結乾燥し白色粉末1.2mgを得た。

質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 2583.6 (計算値2583.4)

HPLC溶出時間 20.4 分

溶出条件

カラム Wakosil-II5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液:0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 10/0 / 0 ~30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

【0097】

参考例13 ヒトGPR8 ligand (1-30): Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr-Leu-Trp (配列番号: 17) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Trp(Boc) を導入したFmoc-Trp(Boc)-O-Cltresin(0.64mmol/g) 0.25mmol を出発原料として参考例 1 2 と同様に配列順通りにアミノ酸を縮合、最後のTrpを導入後樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5) で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参考例 1 2 と同様の方法で精製しTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr-Leu-Trpを得た。

質量分析による  $(M+H)^+$  3543.4 (計算値3544.2)

HPLC溶出時間 21.5 分

溶出条件

カラム Wakosil-II5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液: 0.1% TFA-水、B液: 0.1% TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 10 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

【0098】

参考例 1 4 ヒトGPR8 ligand (1-29): Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr-Leu (配列番号: 20) の製造

参考例 1 2 の樹脂を用い参考例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸を縮合したのち樹脂からの切り出しと精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr-Leuを得る。

【0099】

参考例 1 5 ヒトGPR8 ligand (1-28): Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyr (配列番号: 21) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Tyr( $Bu^t$ ) を導入したのち参考例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精



製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro-Tyrを得る。

【 0 1 0 0 】

参考例 1 6 ヒトGPR8 ligand (1-27) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Pro (配列番号 : 2 2) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Proを導入したのち参考例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser-Proを得る。

【 0 1 0 1 】

参考例 1 7 ヒトGPR8 ligand (1-26) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Ser (配列番号 : 2 3) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Ser(Bu<sup>t</sup>)を導入したのち参考例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg-Serを得る。

【 0 1 0 2 】

参考例 1 8 ヒトGPR8 ligand (1-25) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Arg (配列番号 : 2 4) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Arg(Pbf)を導入したのち参考例 1 3 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg-Argを得る。

【 0 1 0 3 】

参考例 1 9 ヒトGPR8 ligand (1-24) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Arg (配列番号 :

## 25) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33mmol/g) にFmoc-Arg(Pbf)を導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行いTrp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu-Argを得る。

### 【0104】

参考例20 GPR8発現CHO細胞膜画分を用いて測定した23残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのGTP $\gamma$ S結合促進活性

参考例12で合成した23残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログ（以下、hGPR8L(1-23)と記載することがある）を種々の濃度で参考例6に記載した方法でGPR8発現CHO細胞膜画分に投与してGTP $\gamma$ S結合促進活性を測定した。結果を図2に示した。明らかにhGPR8L(1-23)は濃度依存的にGPR8発現CHO細胞膜画分のGTP $\gamma$ S結合を促進した。このことから配列番号：16の構造を有するペプチドがGPR8に対するリガンドであることが明らかとなった。

### 【0105】

参考例21 GPR8発現CHO細胞膜画分を用いて測定した30残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのGTP $\gamma$ S結合促進活性

参考例13で合成した30残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログ（以下、hGPR8L(1-30)と記載することがある）を種々の濃度で参考例6に記載した方法でGPR8発現CHO細胞膜画分に投与してGTP $\gamma$ S結合促進活性を測定した。結果を図3に示した。明らかにhGPR8L(1-30)は濃度依存的にGPR8発現CHO細胞膜画分のGTP $\gamma$ S結合を促進した。このことから配列番号：17の構造を有するペプチドがGPR8に対するリガンドであることが明らかとなった。

### 【0106】

参考例22 GPR8発現CHO細胞を用いて測定した23残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログの細胞内cAMP産生抑制活性

参考例12で合成したhGPR8L(1-23)を種々の濃度で参考例5に記載した方法でGPR8発現CHO細胞に接触させて細胞内cAMP産生抑制活性を測定した。結果を図4に示した。明らかにhGPR8L(1-23)は濃度依存的にGPR8発現CHO

細胞に対して細胞内 cAMP の産生を抑制した。図中、cAMP 合成抑制活性は、フォルスコリンを含む反応用バッファーを添加したときの細胞内 cAMP 量から反応用バッファーを添加したときの細胞内 cAMP 量を減じた量を100%として、hGPR8L(1-23)を加えたときの細胞内 cAMP 量から反応用バッファーを添加したときの細胞内 cAMP 量を減じた量を%として表わした。

【0107】

参考例 23 GPR8 発現 CHO 細胞を用いて測定した30残基の GPR8 リガンドペプチドのヒトホモログの細胞内 cAMP 産生抑制活性

参考例 13 で合成した hGPR8L(1-30) を種々の濃度で参考例 5 に記載した方法で GPR8 発現 CHO 細胞に接触させて細胞内 cAMP 産生抑制活性を測定した。結果を図 5 に示した。明らかに hGPR8L(1-30) は濃度依存的に GPR8 発現 CHO 細胞に対して細胞内 cAMP の産生を抑制した。図 5 中、cAMP 合成抑制活性は、フォルスコリンを含む反応用バッファーを添加したときの細胞内 cAMP 量から反応用バッファーを添加したときの細胞内 cAMP 量を減じた量を100%として、hGPR8L(1-30)を加えたときの細胞内 cAMP 量から反応用バッファーを添加したときの細胞内 cAMP 量を減じた量を%として表わした。

【0108】

参考例 24 マウス TGR26 をコードする cDNA のクローニング

マウス脳 cDNA を鋳型として配列番号：135 の合成プライマーと配列番号：136 の合成プライマーを用いた PCR 法によりマウス TGR26 DNA の増幅を行なった。

反応液の組成は、マウス脳 cDNA 1  $\mu$ l、合成プライマー各 0.2  $\mu$ M、0.8 mM dNTPs、Advantage cDNA Polymerase Mix (CLONTECH) 0.4  $\mu$ l および酵素に付属のバッファーで、総反応量を 20  $\mu$ l とした。サーマルサイクラー (Applied Biosystems 社) を使い、96℃で2分の加熱した後、96℃で30秒、64℃で30秒、72℃で1分の加熱サイクルを30回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。PCR 反応液中の約1100塩基長の増幅 DNA 断片を、TOPO Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従い、pCR 2.1-TOPOへクローニングした。これをエシェリヒア・コリ (Escherichiacoli) TOP10 competent c

ell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator CycleSequencing Ready Reaction Kit (PEバイオシステムズ)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号: 137で表される塩基配列を得た。

配列番号: 137で表される塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したものをマウスTGR26アミノ酸配列とし、配列番号: 138として示す。

配列番号: 138をラット由来のTGR26のアミノ酸配列と比較したところ、96.0%のアミノ酸の一致が認められた。

配列番号: 137で表される塩基配列を有するDNAを含むプラスミドで形質転換した大腸菌を、大腸菌 (*Escherichia coli*) TOP10/pCR2.1-TOPOMOUSE GPR7と命名した。

#### 【0109】

参考例25 ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5' 上流端のクローニング

参考例11に記載したGPR8のリガンドペプチドのヒトホモログ (以下、ヒトGPR8リガンドと記載することがある) の前駆体蛋白の一部をコードするヒトcDNA配列 (配列番号: 14) を基に作製したプライマーでヒト視床下部cDNAを鋳型とした5' RACE PCRを行ない、ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5' 上流塩基配列を明らかにした。5' RACE PCR クローニングは、ヒト視床下部Marathon-Ready cDNA (CLONTECH) を鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号: 33の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号: 34の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はヒト視床下部cDNA 4 $\mu$ l、AP1プライマー0.5 $\mu$ M、配列番号: 33の合成DNAプライマー0.5

$\mu\text{M}$ 、0.4mM dNTPs、LATAqポリメラーゼ（宝酒造）0.2 $\mu\text{l}$ および酵素に付属のGC（I）バッファーで総反応量を20 $\mu\text{l}$ とし、サーマルサイクラー（PEBiosystems）を用い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・240秒のサイクルを30回繰り返し、さらに72℃で10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTAbufferで50倍希釈したPCR反応液2 $\mu\text{l}$ 、AP2プライマー0.5 $\mu\text{M}$ 、配列番号：34の合成DNAプライマー0.5 $\mu\text{M}$ 、0.4mM dNTPs、LATAqポリメラーゼ（宝酒造）0.2 $\mu\text{l}$ および酵素に付属のGC（I）バッファーで総反応量を20 $\mu\text{l}$ とし、サーマルサイクラー（PEBiosystems）を用い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、72℃・180秒のサイクルを4回、次に96℃・30秒、70℃・180秒のサイクルを4回、次に96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを17回、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約1,200塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquickGel Extraction Kit（キアゲン）を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit（Invitrogen）のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒアコリ（Escherichia coli）TOP10 competent cell（Invitrogen）に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit（キアゲン）を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator CycleSequencing Ready Reaction Kit（PE Biosystems）を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：35に示すDNA配列を得た。

【0110】

#### 参考例26 ヒト脳cDNAの作製

ヒト脳cDNAは、Marathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification Kit（CLONTECH）を用いてヒト脳poly A(+) RNA（CLONTECH）から作製した。RACE PCRに供されるcDNAは1st strand cDNA合成を除き、キットに添付のプロトコールに従って作製した。1st strand cDNAは、キットに添付の逆転写酵素AMVの代わりに逆転写

酵素MMLV (-RNase H) (RevTraAce, 東洋紡) を用いて、1  $\mu$ gのヒト脳polyA(+) RNAから合成した。

【0111】

参考例27 ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3' 下流端のクローニング

参考例11に記載のヒトGPR8リガンド前駆体蛋白の一部をコードするヒトcDNA配列(配列番号: 14)を基に作製したプライマーでヒト脳cDNAを鋳型とした3' RACE PCRを行ない、ヒトGPR8リガンドをコードするcDNAの3' 下流塩基配列を明らかにした。3' RACE PCR クローニングは、ヒト脳 cDNAを鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号: 36の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号: 37の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はキットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したヒト脳cDNA 1  $\mu$ l、AP1プライマー0.5  $\mu$ M、配列番号: 36の合成DNAプライマー0.5  $\mu$ M、0.4mM dNTPs、LATAqポリメラーゼ(宝酒造) 0.2  $\mu$ lおよび酵素に付属のGC(I)バッファーで総反応量を20  $\mu$ lとし、サーマルサイクラー(PEBiosystems)を用い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・240秒のサイクルを30回繰り返し、さらに72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTABufferで50倍希釈したPCR反応液1  $\mu$ l、AP2プライマー0.5  $\mu$ M、配列番号: 37の合成DNAプライマー0.5  $\mu$ M、0.4 mM dNTPs、LATAqポリメラーゼ(宝酒造) 0.2  $\mu$ lおよび酵素に付属のGC(I)バッファーで総反応量を20  $\mu$ lとし、サーマルサイクラー(PEBiosystems)を用い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを4回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを4回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを17回、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約600塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquickGel Extraction Kit(キアゲン)を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit(Invitrogen)のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエ

シェリヒア コリ (Escherichiacoli) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator CycleSequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号: 38に示すDNA配列を得た。

## 【0112】

参考例28 ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAのクローニング

ヒト視床下部cDNAを鋳型として、ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流塩基配列を基に作製したプライマーとヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3'下流塩基配列を基に作製したプライマーでPCR増幅を行なうことにより、ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAをクローニングした。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、ヒト視床下部Marathon-Ready cDNA (CLONTECH) 1.0  $\mu$ l、配列番号: 39の合成DNAプライマー0.5  $\mu$ M、配列番号: 40の合成DNAプライマー0.5  $\mu$ M、0.4mM dNTPs、2.5 mM  $MgCl_2$ 、5% DMSO、LATAqポリメラーゼ(宝酒造)0.2  $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20  $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PEBiosystems) を用い、96°C・60秒の加熱の後、96°C・30秒、64°C・30秒、72°C・120秒のサイクルを35回、最後に72°Cで10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約700塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquickGel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコルに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをシェリヒア コリ (Escherichiacoli) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつ

ま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン)を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号: 41に示すDNA配列を得た。

この配列(配列番号: 41)はヒトGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするためこのDNAを含むプラスミドで形質転換した大腸菌をTOP10/pCR2.1-TOPOヒトGPR8リガンド前駆体 (*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOPO Human GPR8 Ligand Precursor) と命名した。

配列番号: 41に示すDNA配列には、参考例11に記載したヒトGPR8リガンドペプチドのアミノ酸配列をコードするようなフレームが存在するが、その5'上流側には蛋白翻訳の開始コドンであると予想されるATGが存在しない。しかし、これまでに幾つかの蛋白でATG以外のコドンを開始コドンとすることが予想されている例が報告されている(ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(H. Prats et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86巻、1836-1840頁、1989年、R. Z. FlorkiewiczおよびA. Sommer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86巻、3978-3981頁、1989年)、マウスレチノイン酸受容体 $\beta 4$ (S. Nagpal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89巻、2718頁、1992年)、ヒトホスホリボシルピロリン酸合成酵素(M. Taira et al., *J. Biol. Chem.*, 265巻、16491-16497頁、1990年)、ショウジョウバエコリンアセチル転移酵素(H. Sugihara et al., *J. Biol. Chem.*, 265巻、21714-21719頁、1990年))。

これらの例ではATGに代わりLeuをコードするCTGが開始コドンとして仮定されていることが多い。ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白においても同様であると考え、後述のブタあるいはラットのGPR8リガンドホモログの前駆体蛋白との比較からこれらの前駆体蛋白における開始コドンと予想されるATGにほぼ対応する位置に存在するCTGコドンを開始コドンと仮定し、前駆体蛋白の配列を推定した。この仮想的ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列を配列番号: 42に示した。また、仮想的ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列およびDNA配列を図6に示した。



## 【0113】

## 参考例 29 ブタ脊髄 cDNA の作製

ブタ脊髄 cDNA は、Marathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification Kit (CLONTECH) を用いてブタ脊髄 poly A(+) RNA から作製した。ブタ脊髄 poly A(+) RNA は、ブタ脊髄から以下のように調製した。ブタ脊髄を、ISOGEN (日本ジーン) 中にてポリトロンホモゲナイザーで完全に破碎し、この破碎溶液から ISOGEN 溶液を用いた total RNA 調製法に従ってブタ脊髄 total RNA を得た。次に、ブタ脊髄 total RNA から mRNA Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech) に添付の oligo dT cellulose カラムを用いた クロマトグラフィーを 2 回行なうことにより、7  $\mu$ g のブタ脊髄 poly A(+) RNA を得た。RACE PCR に供した cDNA は 1st strand cDNA 合成を除き、キットに添付のプロトコールに従って作製した。1st strand cDNA 合成は、キットに添付の逆転写酵素 AMV の代わりに逆転写酵素 MMLV (-RNase H) (RevT raAce, 東洋紡) を用いて、1  $\mu$ g のブタ脊髄 poly A(+) RNA から合成した。

## 【0114】

## 参考例 30 ブタ GPR8 リガンド前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流末端のクローニング

1 回目の 5' RACE PCR クローニングと、その PCR 増幅 DNA の塩基配列を利用した 2 回目の 5' RACE PCR クローニングにより、GPR8 のリガンドペプチドのブタホモログ (以下、ブタ GPR8 リガンドと記載することがある) の前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流塩基配列を明らかにした。

1 回目の 5' RACE PCR クローニングは、上記ブタ脊髄 cDNA を鋳型としてキットに添付の AP1 プライマーと配列番号: 43 の合成プライマーで PCR 反応を行ない、次にこの PCR 反応液を鋳型としてキットに添付の AP2 プライマーと配列番号: 44 の合成プライマーで PCR 反応を行なうことにより達成された。PCR の反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はキットに添付の Tricine-EDTA Buffer で 50 倍希釈したブタ脊髄 cDNA 4  $\mu$ l、AP1 プライマー 0.5  $\mu$ M、配列番号: 43 の合成 DNA プライマー 0.5  $\mu$ M、0.4mM dNTPs、LAT aq ポリメラーゼ (宝酒造) 0.2  $\mu$ l および酵素に付属の GC (I) バッファーで総反応量を 20  $\mu$ l とし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を使い、96°C・120 秒の

加熱の後、96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを30回繰り返し、さらに72℃で10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTABufferで100倍希釈したPCR反応液1μl、AP2プライマー0.5μM、配列番号：44の合成DNAプライマー0.5μM、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2μlおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20μlとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、72℃・180秒のサイクルを3回、次に96℃・30秒、70℃・180秒のサイクルを3回、次に96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを4回、次に96℃・30秒、64℃・30秒、72℃・180秒のサイクルを15回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約300塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquickGel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (Escherichiacoli) TOP10F' competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晩培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：45に示すDNA配列を得た。

2回目の5' RACE PCR クローニングは、ブタ脊髄cDNAを鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号：46の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号：47の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、キットに添付のTricine-EDTABufferで50倍希釈したブタ脊髄cDNA 1μl、AP1プライマー0.5μM、配列番号：46の合成DNAプライマー0.5μM、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2μlおよび酵素に付属のバッファーで総反

応量を20 $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を使い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、72℃・180秒のサイクルを5回、次に96℃・30秒、70℃・180秒のサイクルを5回、次に96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを20回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTABufferで100倍希釈したPCR反応液1 $\mu$ l、AP2プライマー0.5 $\mu$ M、配列番号: 47の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を使い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・180秒のサイクルを31回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを2.0%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約200塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquickGel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒアコリ (*Escherichia coli*) TOP10F' competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator CycleSequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号: 48に示すDNA配列を得た。

#### 【0115】

参考例31 ブタGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3' 下流端のクローニング

ブタGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5' 上流端の塩基配列を基に作製したプライマーを用いた3' RACE PCRクローニングにより、ブタGPR8リガンドペプチドの前駆体蛋白をコードするcDNAの3' 下流塩基配列を明らかにした。3' RACE PCR クローニングは、ブタ脊髄cDNAを鋳型として

キットに添付のAP1プライマーと配列番号：49の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号：50の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、キットに添付のTricine-EDTABufferで50倍希釈したブタ脊髄cDNA 1 $\mu$ l、AP1プライマー0.5 $\mu$ M、配列番号：49の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を使い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを5回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、70 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを5回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを2回、70 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを5回、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを2回繰り返す、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTABufferで100倍希釈したPCR反応液1 $\mu$ l、AP2プライマー0.5 $\mu$ M、配列番号：50の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を使い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを31回繰り返す、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを2.0%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約650塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquickGel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒアコリ (*Escherichia coli*) TOP10F' competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-gal、IPTGを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator CycleSequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：51に示すDNA配列を得た。

【0116】

## 参考例 32 ブタ GPR8 リガンド前駆体蛋白をコードする cDNA のクローニング

ブタ脊髄 cDNA を鋳型として、ブタ GPR8 リガンド前駆体蛋白をコードする cDNA の 5' 上流塩基配列を基に作製したプライマーとブタ GPR8 リガンド前駆体蛋白をコードする cDNA の 3' 下流塩基配列を基に作製したプライマーで PCR 増幅を行なうことにより、ブタ GPR8 リガンド前駆体蛋白をコードする cDNA をクローニングした。PCR の反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、キットに添付の Tricine-EDTA Buffer で 50 倍希釈したブタ脊髄 cDNA 1  $\mu$ l、配列番号：52 の合成 DNA プライマー 0.5  $\mu$ M、配列番号：53 の合成 DNA プライマー 0.5  $\mu$ M、0.4mM dNTPs、Advantage 2 ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2  $\mu$ l および酵素に付属のバッファーで総反応量を 20  $\mu$ l とし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、96℃・60 秒の加熱の後、96℃・30 秒、72℃・75 秒のサイクルを 4 回、次に 96℃・30 秒、70℃・75 秒のサイクルを 4 回、次に 96℃・30 秒、68℃・75 秒のサイクルを 4 回、次に 96℃・30 秒、64℃・30 秒、72℃・45 秒のサイクルを 5 回、次に 96℃・30 秒、60℃・30 秒、72℃・45 秒のサイクルを 20 回繰り返し、最後に 72℃ で 10 分間保温した。増幅した DNA を 1.2 % のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約 600 塩基長の DNA をカミソリで切り出し、DNA を QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。この DNA を、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従って pCR2.1-TOPO ベクターへクローニングした。これをエシェリヒアコリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA 挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよび X-gal を含む LB 寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含む LB 培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミド DNA を調整した。塩基配列の決定のための反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：54 に示す DNA 配列を得た。この配列 (配列番号：54) は

ブタGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするためこのDNAを含むプラスミドで形質転換した大腸菌をTOP10/pCR2.1-TOP0ブタGPR8リガンド前駆体 (*Escherichiacoli* TOP10/pCR2.1-TOP0 Porcine GPR8 Ligand Precursor) と命名した。

配列番号：54のDNA配列がコードするブタGPR8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列を配列番号：55に示した。この前駆体蛋白のアミノ酸配列には参考例10に記載のGPR8発現細胞膜画分に対するGTP $\gamma$ S結合活性を指標にブタ視床下部より単離されたGPR8リガンドペプチドのアミノ酸配列分析によって明らかにされたアミノ末端から17残基までの配列が存在した。さらにその配列のカルボキシ末端側にはGPR8リガンドペプチドのヒトホモログ前駆体蛋白の場合と同様に、通常の生理活性ペプチドが切り出されると考えられるArg-Ar gの配列 (Seidah, N. G. et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 839巻、9-24頁、1998年) が2ヶ所存在した。このことから、GPR8リガンドペプチドのブタホモログのアミノ酸配列は配列番号：56および57のいずれかもしくは両方であると推定された。ブタGPR8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列およびDNA配列を図7に示した。

【0117】

参考例33 ラットGPR8リガンド前駆体蛋白の一部をコードするcDNA断片のクローニング

参考例10に記載したように、GPR8発現細胞膜画分に対するGTP $\gamma$ S結合活性を指標にブタ視床下部から精製したペプチドのアミノ末端から17アミノ酸配列 (配列番号：6) に基づいてデータベース検索を行なったところ、配列番号：11の塩基配列に合致するラットEST塩基配列 (アクセッション番号：H31598) が見出された。このDNA配列は15アミノ酸の配列がブタ視床下部から精製したペプチドのアミノ酸配列 (配列番号：6) と同一となる翻訳枠を持っていた。このH31598は、ラットPC12細胞から作製したcDNAライブラリー由来のEST配列であり、未確定な7塩基を含む260塩基からなる。このH31598はGPR8リガンドのラットホモログペプチド (以下、ラットGPR8リガンドと記載することがある) の前駆体蛋白の一部をコードしていると推定されたのでその正確な塩基配列を決定するため、H31598の5'塩基配列と3'塩基配列を基に作製

したそれぞれのプライマーでラット脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH)を鋳型としたPCRクローニングを行なった。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。ラット脳Marathon cDNA (CLONTECH) 2 $\mu$ l、配列番号：60の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、配列番号：61の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.2 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を使い、96℃・60秒の加熱の後、次に96℃・30秒、60℃・30秒、72℃・60秒のサイクルを35回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを4.0%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約250塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquickGel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒアコリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator CycleSequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：62に示すDNA配列を得た。PCRクローニングしたDNAの塩基配列 (配列番号：62) とH31598の塩基配列との比較により、1塩基欠失の読み誤りがH31598の塩基配列にあることが明らかになった。

#### 【0118】

参考例34 ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5' 上流端のクローニング

5' RACE PCR クローニングによりラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5' 上流塩基配列を明らかにした。5' RACE PCR クローニングは、ラット脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH)を鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号：63の合成プライマーでPCR反応を行ない、次

にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号：64の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はラット脳Marathon cDNA 2 $\mu$ l、AP1プライマー0.5 $\mu$ M、配列番号：63の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、0.4mM dNTPs、LATAqポリメラーゼ（宝酒造）0.2 $\mu$ lおよび酵素に付属のGC（I）バッファーで総反応量を20 $\mu$ lとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・120秒のサイクルを30回繰り返し、さらに72℃で10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで200倍希釈したPCR反応液2 $\mu$ l、AP2プライマー0.5 $\mu$ M、配列番号：64の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC2ポリメラーゼ（CLONTECH）0.2 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 $\mu$ lとし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・120秒のサイクルを31回、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約600塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquickGel Extraction Kit（キアゲン）を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit（Invitrogen）のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒアコリ（*Escherichia coli*）TOP10 competent cell（Invitrogen）に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit（キアゲン）を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（PE Biosystems）を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：65に示すDNA配列を得た。

【0119】

参考例35 ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3' 下流端のクローニング

ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5' 上流端の塩基



配列を基に作製したプライマーおよびラットGPR8リガンド前駆体蛋白の一部をコードするcDNA断片配列を基に作製したプライマーを用いた3' RACE PCR クローニングにより、ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3' 下流塩基配列を明らかにした。3' RACE PCR クローニングは、ラット脳Marathon-Ready cDNA (CLONTECH)を鋳型としてキットに添付のAP1プライマーと配列番号: 66の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のAP2プライマーと配列番号: 67の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、ラット脳Marathon-Ready cDNA 2 $\mu$ l、AP1プライマー0.5 $\mu$ M、配列番号: 66の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を使い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを30回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで200倍希釈したPCR反応液2 $\mu$ l、AP2プライマー0.5 $\mu$ M、配列番号: 67の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、0.4 mM dNTPs、Advantage-GC2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を使い、96 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・180秒のサイクルを30回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約600塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing

ing Ready Reaction Kit (PE Biosystems)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：68に示すDNA配列を得た。

【0120】

参考例36 ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAのクローニング

ラット脳cDNAを鋳型として、ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5' 上流塩基配列を基にしたプライマーとラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3' 下流塩基配列を基にしたプライマーでPCR増幅を行なうことにより、ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAをクローニングした。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、ラット脳Marathon-Ready cDNA 1 $\mu$ l、配列番号：69の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、配列番号：70の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、0.4mM dNTPs、Advantage 2ポリメラーゼ(CLONTECH) 0.4 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PEBiosystems)を用い、96℃・60秒の加熱の後、96℃・30秒、60℃・30秒、72℃・60秒のサイクルを35回繰り返し、最後に72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.2%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約750塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquickGel Extraction Kit (キアゲン)を用いて回収した。このDNAを、TOPOTA Cloning Kit (Invitrogen)のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOTAベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ(Escherichiacoli) TOP10 competent cell (Invitrogen)に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン)を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator CycleSequencing Ready Reaction Kit(PE Biosystems)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：71に示すDNA配列を得た。この配列(配列番号：71)は、ラットGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするためこのDNAを含むプラスミドで

形質転換した大腸菌をTOP10/pCR2.1-TOP0ラットGPR8リガンド前駆体 (*Escherichiacoli* TOP10/pCR2.1-TOP0 Rat GPR8 Ligand Precursor) と命名した。

配列番号：71のDNA配列がコードするラットGPR8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列を配列番号：72に示した。この前駆体蛋白のアミノ酸配列には参考例10に記載のGPR8発現細胞膜面分に対するGTP $\gamma$ S結合活性を指標にブタ視床下部より単離されたGPR8リガンドペプチドのアミノ酸配列分析によって明らかにされたアミノ末端から17残基までの配列と5残基目および17残基目のアミノ酸のみが異なる類似した配列が存在した。さらにその配列のカルボキシ末端側にはGPR8リガンドペプチドのヒトあるいはブタホモログ前駆体蛋白の場合と同様に、通常の生理活性ペプチドが切り出されと考えられるArg-Argの配列 (Seidah, N. G. et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 839巻、9-24頁、1998年) が2ヶ所存在した。これらのことから、GPR8リガンドペプチドのラットホモログのアミノ酸配列は配列番号：73および74のいずれかもしくは両方であると推定された。ラットGPR8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列およびDNA配列を図8に示した。

#### 【0121】

参考例37 マウスGPR8リガンド前駆体蛋白の一部をコードするcDNA断片のクローニング

GPR8リガンドペプチドのマウスホモログ (以下、マウスGPR8リガンドと記載することがある) の前駆体蛋白を取得するため、マウス精巣cDNAを鋳型として、PCR増幅を行ない、増幅DNAの塩基配列を決定した。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。マウス精巣cDNA (CLONTECH) 1 $\mu$ l、配列番号：78の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、配列番号：79の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、0.4mM dNTPs、LTAqポリメラーゼ (宝酒造) 0.2 $\mu$ lおよび酵素に付属のGC (I) バッファーで総反応量を20 $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PEBiosystems) を使い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを10回繰り返し、次に96 $^{\circ}$ C・30秒、64 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを25回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約350塩基長のDNAをカミソリで

切り出し、DNAをQIAquickGel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒアコリ (*Escherichia coli*) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator CycleSequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems)を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読した(配列番号: 80)。

【0122】

参考例38 マウス脳cDNAの作製

マウス脳cDNAは、SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH)を用いてマウス脳polyA(+) RNA (CLONTECH)から、キットに添付のプロトコールに従って作製した。合成した1st strand cDNA溶液を、キットに添付のTricine-EDTABufferで10倍に希釈し、この溶液をRACE PCR反応に供した。

【0123】

参考例39 マウスGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流端のクローニング

5' RACE PCR クローニングにより、マウスGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの5'上流塩基配列を明らかにした。5' RACE PCR クローニングは、マウス脳cDNAを鋳型としてSMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kitに添付のUniversal Primer Mixと配列番号: 81の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のNested Universal Primerと配列番号: 82の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液はマウス脳cDNA 1 $\mu$ l、Universal Primer Mix 2 $\mu$ l、配列番号: 81の合成DNAプライマー0.2 $\mu$ M、0.8 mM dNTPs、Advantage-GC2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 $\mu$ l

および酵素に付属のバッファーで総反応量を $20\mu\text{l}$ とし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、 $96^{\circ}\text{C} \cdot 120\text{秒}$ の加熱の後、 $96^{\circ}\text{C} \cdot 30\text{秒}$ 、 $68^{\circ}\text{C} \cdot 120\text{秒}$ のサイクルを30回繰り返し、さらに $72^{\circ}\text{C}$ で10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTA Bufferで50倍希釈したPCR反応液 $0.5\mu\text{l}$ 、Nested Universal Primer  $0.5\mu\text{M}$ 、配列番号: 82の合成DNAプライマー $0.5\mu\text{M}$ 、 $0.8\text{mM}$  dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH)  $0.4\mu\text{l}$ および酵素に付属のバッファーで総反応量を $20\mu\text{l}$ とし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を用い、 $96^{\circ}\text{C} \cdot 120\text{秒}$ の加熱の後、 $96^{\circ}\text{C} \cdot 30\text{秒}$ 、 $60^{\circ}\text{C} \cdot 30\text{秒}$ 、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 120\text{秒}$ のサイクルを30回繰り返し、さらに $72^{\circ}\text{C}$ で10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約300塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAを、TOP10 TA Cloning Kit (Invitrogen)のプロトコールに従ってpCR2.1-TOP10ベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (Escherichia coli) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号: 83に示すDNA配列を得た。

## 【 0 1 2 4 】

参考例4.0 マウスGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3' 下流端のクローニング

3' RACE PCRクローニングにより、マウスGPR8リガンド前駆体蛋白をコードするcDNAの3' 下流塩基配列を明らかにした。3' RACE PCR クローニングは、マウス脳cDNAを鋳型としてSMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kitに添付のUniversal Primer Mixと配列番号: 84の合成プライマーでPCR反応を行ない、次にこのPCR反応液を鋳型としてキットに添付のNested Universal Pr

imerと配列番号：85の合成プライマーでPCR反応を行なうことにより達成された。PCRの反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、マウス脳cDNA1 $\mu$ l、Universal Primer Mix 2 $\mu$ l、配列番号：84の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、0.8 mM dNTPs、Advantage-GC2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を使い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、68 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを30回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。次に、キットに添付のTricine-EDTABufferで50倍希釈したPCR反応液0.5 $\mu$ l、Nested Universal Primer 0.5 $\mu$ M、配列番号：85の合成DNAプライマー0.5 $\mu$ M、0.8mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファーで総反応量を20 $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PE Biosystems) を使い、96 $^{\circ}$ C・120秒の加熱の後、96 $^{\circ}$ C・30秒、64 $^{\circ}$ C・30秒、72 $^{\circ}$ C・120秒のサイクルを30回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約700塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquickGel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAをTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ (Escherichiacoli) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator CycleSequencing Ready Reaction Kit (PE Biosystems) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：86に示すDNA配列を得た。

【0125】

参考例41 マウスGPR8リガンド前駆体蛋白質をコードするcDNAのクローニング

マウス脳cDNAを鋳型として、マウスGPR8リガンド前駆体蛋白をコード

する cDNA の 5' 上流塩基配列を基にしたプライマーとマウス GPR8 リガンド前駆体蛋白をコードする cDNA の 3' 下流塩基配列を基にしたプライマーで PCR 増幅を行なうことにより、マウス GPR8 リガンド前駆体蛋白をコードする cDNA をクローニングした。PCR の反応液組成と反応条件は以下のとおりである。反応液は、マウス脳 cDNA 0.5  $\mu$ l、配列番号：87 の合成 DNA プライマー 0.5  $\mu$ M、配列番号：88 の合成 DNA プライマー 0.5  $\mu$ M、1.6 mM dNTPs、LATAq ポリメラーゼ（宝酒造）0.2  $\mu$ l および酵素に付属の GC (I) バッファーで総反応量を 20  $\mu$ l とし、サーマルサイクラー（PE Biosystems）を用い、96℃・120 秒の加熱の後、96℃・30 秒、64℃・30 秒、72℃・120 秒のサイクルを 40 回繰り返し、最後に 72℃ で 10 分間保温した。増幅した DNA を 1.5% のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約 700 塩基長の DNA をカミソリで切り出し、DNA を QIAquick Gel Extraction Kit（キアゲン）を用いて回収した。この DNA を、TOPO TA Cloning Kit（Invitrogen）のプロトコールに従って pCR2.1-TOPO ベクターへクローニングした。これをエシェリヒア コリ（*Escherichia coli*）TOP10 competent cell（Invitrogen）に導入して形質転換した後、cDNA 挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよび X-gal を含む LB 寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含む LB 培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit（キアゲン）を用いてプラスミド DNA を調整した。塩基配列の決定のための反応は BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（PE Biosystems）を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：89 に示す DNA 配列を得た。この配列（配列番号：89）は、マウス GPR8 リガンド前駆体蛋白をコードするため、この DNA を含むプラスミドで形質転換した大腸菌を TOP10/pCR2.1-TOPO マウス GPR8 リガンド前駆体（*Escherichia coli* TOP10/pCR2.1-TOPO Mouse GPR8 Ligand Precursor）と命名した。

配列番号：89 に示す DNA 配列には、参考例 10 に記載の GPR8 発現細胞膜画分に対する GTP  $\gamma$  S 結合活性を指標にブタ膵床下部より単離された GPR8 リガンドペプチドのアミノ酸配列分析によって明らかにされたアミノ末端から 17 残基までの配列と 5 残基目および 17 残基目のアミノ酸のみが異なる類似し

たアミノ酸配列をコードするようなフレームが存在する。しかし、ヒトGPR8リガンド前駆体の場合と同様に、その5'上流側には蛋白翻訳の開始コドンであると予想されるATGが存在しない。しかし、ヒトGPR8リガンド前駆体蛋白において推測されたように、ブタあるいはラットのGPR8リガンドホモログの前駆体蛋白との比較からこれらの前駆体蛋白における開始コドンと予想されるATGにほぼ対応する位置に存在するCTGコドンを開始コドンと仮定し、マウスGPR8リガンド前駆体蛋白の配列を推定した。この仮想的マウスGPR8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列を配列番号：90に示した。マウスGPR8リガンドのアミノ酸配列と予想される配列のカルボキシ末端側にはGPR8リガンドペプチドのヒト、ブタあるいはラットホモログ前駆体蛋白の場合と同様に、通常の生理活性ペプチドが切り出されると考えられるArg-Argの配列(Seidah, N. G. et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 839巻、9-24頁、1998年)が2ヶ所存在した。これらのことから、GPR8リガンドペプチドのマウスホモログのアミノ酸配列は配列番号：91および92のいずれかもしくは両方であると推定された。なお、配列番号：91の23残基型マウスGPR8リガンドのアミノ酸配列は、23残基型ラットGPR8リガンドのアミノ酸配列(配列番号：73)と一致している。仮想的マウスGPR8リガンド前駆体蛋白のアミノ酸配列およびDNA配列を図9に示した。

#### 【0126】

参考例42 ラクトパーオキシダーゼ法を用いた [ $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>2</sup>]-hGPR8L(1-23)および [ $^{125}\text{I}$ -Tyr<sup>10</sup>]-hGPR8L(1-23)の作製

DMSO 5  $\mu\text{l}$  に溶かした hGPR8L(1-23) (配列番号：16 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド) 1 nmol を 0.1 M 塩化ニッケル 5  $\mu\text{l}$  と混合し、0.1 M HEPES (pH 7) に溶かした 0.001% 過酸化水素水 10  $\mu\text{l}$ 、0.1 M HEPES (pH 7) に溶かした ラクトパーオキシダーゼ (シグマ社) 10  $\mu\text{g/ml}$  を 10  $\mu\text{l}$  および [ $^{125}\text{I}$ ] NaI 37 MBq (NEN ライフサイエンス プロダクツ社) 10  $\mu\text{l}$  を混合後、室温で 60 分反応し、以下の条件で HPLC 分取した。

用いたカラムは、ODS-80TM (4.6 mm x 15cm) (トーソー社)、溶出液Aとして10% アセトニトリル/0.1% TFA、溶出液Bとして60% アセトニトリル/0.1% TFA



を用い、0-0 (2min)、0-30 (3 min)、30-38 (5 min)、38-43 (55 min) %B/A+B のグラディエント溶出法を行なった。流速は1mL/min、カラム温度は25℃、検出は220nmの吸光度を用いて行った。

hGPR8L(1-23)には、チロシン残基が2つ存在するので、ヨード化によって、 $[^125\text{I-Tyr}^2]$ -hGPR8L(1-23)および $[^125\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)が生成する。このHPLC条件では、hGPR8L(1-23)が24分、 $[^125\text{I-Tyr}^2]$ -hGPR8L(1-23)が30分、 $[^125\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)が32分付近に溶出した。

【0127】

参考例43  $[^125\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)を用いた受容体結合実験

参考例42に記載したように作製した $[^125\text{I}]$ -標識hGPR8L(1-23)および参考例6に記載した方法と同様にしてヒトGPR8発現CHO細胞から調製した細胞膜画分を用いて受容体結合実験を行なった。

ヒトGPR8発現CHO細胞から調製した細胞膜画分を、アッセイ用バッファ (25 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸)、0.05% CHAPS (3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン硫酸)、0.1%BSA (ウシ血清アルブミン)、0.25 mM PMSF (フェニルメタンスルホニルフルオリド)、1μg/ml ペプスタチン、20μg/ml ロイペプチン、pH7.4) で各種濃度に希釈後、ポリプロピレン製試験管 (Falcon 2053) に200μlずつ分注した。最大結合量 (TB) を測定するために2μlのDMSOと7nMの $[^125\text{I-Tyr}^2]$ -hGPR8L(1-23)または $[^125\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)2μlを膜画分溶液に添加した。また、非特異的結合 (NSB) を測定するために100μM hGPR8L(1-23)のDMSO溶液2μlと7 nMの $[^125\text{I-Tyr}^2]$ -hGPR8L(1-23)または $[^125\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)2μlを膜画分溶液に添加した。25℃で60分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマングラスフィルター (GF-F) を用いて反応液を吸引ろ過した。ろ過後、γ-カウンターを用いてろ紙上に残った放射活性を測定し、最大結合量から非特異的結合量を引いて特異的結合量 (SB) を見積もった。 $[^125\text{I-Tyr}^2]$ -hGPR8L(1-23)を用いた場合に比べて $[^125\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)を用いた方が、特異的結合量が2倍多かったため実際の結合実験には $[^125\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)を用いた。膜画分の濃度を変化させると膜画分の濃度に依存した $[^125\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)の

特異的な結合が認められた。また、膜面分濃度を $5\mu\text{g/ml}$ に設定して阻害率(%)からhGPR8L(1-23)の50%阻害濃度( $\text{IC}_{50}$ 値)を算出したところ、 $\text{IC}_{50}$ 値は0.25 nMであった。図10に種々の濃度におけるhGPR8L(1-23)の結合阻害を示す。

【0128】

参考例44 ヒトGPR8 ligand (1-23)酸化体: Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met(O)-Gly-Leu (配列番号: 95) の製造

参考例12の化合物0.45 mg を 50% 酢酸水0.5 mlに溶解後、0.3%過酸化水素水0.05 mlを 加え、室温にて8時間放置した。減圧濃縮後SepPakにより精製し、白色粉末0.443mgを得た。

質量分析による $(\text{M}+\text{H})^+$ : 2599.2 (計算値2599.4)

HPLC溶出時間: 19.1 分

溶出条件

カラム: Wakosil-II5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100

/0~0/70へ直線型濃度勾配溶出(35分)

流速: 1.0ml/分

【0129】

参考例45 ヒトGPR8 ligand (1-22): Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly (配列番号: 96) の製造

市販2-chlorotrityl resin (Clt resin, 1.33 mmol/g) にFmoc-Gly を導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

【0130】

参考例46 ヒトGPR8 ligand (1-21): Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met (配列番号: 97) の製造

市販2-chlorotritylresin (Clt resin, 1.33mmol/g)にFmoc-Met を導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を

行ない目的物を得た。

【0131】

参考例47 ヒトGPR8 ligand (1-20) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu (配列番号 : 98) の製造

市販2-chlorotritylresin (Clt resin, 1.33mmol/g)にFmoc-Leuを導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

質量分析による $M^+$  : 2282.8 (計算値2282.6)

HPLC溶出時間 : 17.2 分

溶出条件

カラム : Wakosil-II5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液 : A液:0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100/0~0/70へ直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 : 1.0ml/分

【0132】

参考例48 ヒトGPR8 ligand (1-19) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu (配列番号 : 99) の製造

市販2-chlorotritylresin (Clt resin, 1.33mmol/g)にFmoc-Leuを導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

質量分析による $M^+$  : 2169.6 (計算値2169.5)

HPLC溶出時間 : 16.4 分

溶出条件

カラム : Wakosil-II5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液 : A液:0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100/0~0/70へ直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 : 1.0ml/分

【0133】

参考例49 ヒトGPR8 ligand (1-18) : Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-

Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly (配列番号: 100) の製造

市販2-chlorotritylresin (Clt resin, 1.33mmol/g)にFmoc-Glyを導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

質量分析による $M^+$ : 2056.8 (計算値2056.3)

HPLC溶出時間: 14.2 分

溶出条件

カラム: Wakosil-II5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液: 0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100/0~0/70へ直線型濃度勾配溶出(35分)

流速: 1.0ml/分

【0134】

参考例50 ヒトGPR8 ligand (1-17): Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-

Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala (配列番号: 101) の製造

市販2-chlorotritylresin (Clt resin, 1.33mmol/g)にFmoc-Alaを導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

【0135】

参考例51 ヒトGPR8 ligand (1-16): Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-

Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala (配列番号: 102) の製造

市販2-chlorotritylresin (Clt resin, 1.33mmol/g)にFmoc-Alaを導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得た。

【0136】

参考例52 ブタGPR8 ligand (1-23): Trp-Tyr-Lys-His-Thr-Ala-Ser-Pro-Arg-

Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 56) の製造

市販2-chlorotritylresin (Clt resin, 1.33mmol/g)にFmoc-Leuを導入したのち参考例13と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行な

い目的物を得た。

質量分析による  $(M+H)^+$ : 2585.2 (計算値2585.4)

HPLC 溶出時間: 20.2 分

溶出条件

カラム: Wakosil-II5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液: 0.1% TFA-水、B液: 0.1% TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100

/0~0/70へ直線型濃度勾配溶出(35分)

流速: 1.0ml/分

【0137】

参考例 53 ラット/マウス GPR8 ligand (1-23): Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ser-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu の製造

(配列番号: 73 および配列番号: 91)

参考例 52 と同様に配列順にアミノ酸の縮合と樹脂からの切り出し、精製を行ない目的物を得ることができる。

【0138】

参考例 54 ブタ GPR8 ligand (1-23) 酸化体: Trp-Tyr-Lys-His-Thr-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met(0)-Gly-Leu (配列番号: 103) の製造

参考例 52 の化合物を用い参考例 44 と同様に酸化して目的物を得た。

質量分析による  $(M+H)^+$ : 2601.3 (計算値2601.4)

HPLC 溶出時間: 18.9 分

溶出条件

カラム: Wakosil-II5C18HG (4.6 x 100 mm)

溶離液: A液: 0.1% TFA-水、B液: 0.1% TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 100

/0~0/70へ直線型濃度勾配溶出(35分)

流速: 1.0ml/分

【0139】

参考例 55 ラット/マウス GPR8 ligand (1-23) 酸化体: Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ser-Gly-Leu-Leu-Met(0)-Gly-L

eu (配列番号: 104) の製造

参考例53の化合物を用い参考例44と同様に酸化して目的物を得ることができる。

【0140】

参考例56  $[N^{\alpha}\text{-Acetyl-Trp}^1]$ -ヒトGPR8 ligand (1-23): Ac-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 106) の製造

参考例12で調製した樹脂のFmoc基を除去、無水酢酸でアセチル化した後、TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5)で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参考例12と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による  $(M+H)^+$  2626.12625.8 (計算値2627.12626.1)

HPLC溶出時間 21.4 分

溶出条件

カラム Wakosil-II5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液:0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、A/B: 10 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

【0141】

参考例57 ヒトGPR8 ligand (2-23): Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 107) の製造

参考例12と同様に所望のアミノ酸配列を樹脂に導入した。最後のTyrを導入後樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、TFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5)で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参考例12と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による  $(M+H)^+$  2397.1 (計算値2397.3)

HPLC溶出時間 19.9 分

溶出条件

カラム Wakosil-II5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液:0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 10  
0 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

【0142】

参考例58 ヒトGPR8 ligand (4-23): His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-  
Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 108) の製造

参考例12と同様に所望のアミノ酸配列を樹脂に導入した。最後のHisを導入  
後樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、 TFA / thioanisole /  
m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5)で  
処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参  
考例12と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 2106.0 (計算値2106.1)

HPLC溶出時間 20.0 分

溶出条件

カラム Wakosil-II5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液:0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 10  
0 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

【0143】

参考例59 ヒトGPR8 ligand (9-23): Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-  
Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 109) の製造

参考例12と同様に所望のアミノ酸配列を樹脂に導入した。最後のArgを導入  
後樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、 TFA / thioanisole /  
m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5)で  
処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参  
考例12と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 1615.0 (計算値1614.9)

HPLC 溶出時間 20.2 分

溶出条件

カラム Wakosil-II5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液:0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 10  
0 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

【0144】

参考例 6 0 ヒトGPR8 ligand (15-23): Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu  
u (配列番号: 1 1 0) の製造

参考例 1 2 と同様に所望のアミノ酸配列を樹脂に導入した。最後のArgを導入  
後樹脂から切り出す前にFmoc基を樹脂上で除去したのち、 TFA / thioanisole /  
m-cresol / triisopropylsilane/ ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5/ 2.5)で  
処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参  
考例 1 2 と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 901.4 (計算値901.5)

HPLC 溶出時間 20.2 分

溶出条件

カラム Wakosil-II5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液:0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 10  
0 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

【0145】

参考例 6 1 [N-Acetyl-Tyr<sup>2</sup>]-ヒトGPR8 ligand (2-23): Ac-Tyr-Lys-His-Val-A  
la-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配  
列番号: 1 1 1) の製造

参考例 5 7 で調製した樹脂を無水酢酸でアセチル化した後、参考例 5 7 と同様に  
処理、精製し目的物を得た。

質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 2439.3 (計算値2439.3)

HPLC 溶出時間 20.2 分



溶出条件

カラム Wakosil-II5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液:0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 10  
0 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

【0146】

参考例62 [D-Trp<sup>1</sup>]-ヒトGPR8 ligand (1-23): D-Trp-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 112) の製造

参考例12のFmoc-Trp(Boc)の代りにFmoc-D-Trp(Boc)を用い同様に目的物を得た。

質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 2583.4 (計算値2583.4)

HPLC溶出時間 20.6 分

溶出条件

カラム Wakosil-II5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液:0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 10  
0 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

【0147】

参考例63 [N-3-Indolepropanoyl-Tyr<sup>2</sup>]-ヒトGPR8 ligand (2-23): 3-Indolepropanoyl-Tyr-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu-Met-Gly-Leu (配列番号: 113) の製造

参考例12のFmoc-Trp(Boc)の代りに3-Indolepropionic acidを用い所望の樹脂を得、これをTFA / thioanisole / m-cresol / triisopropylsilane / ethanedithiol (85 / 5 / 5 / 2.5 / 2.5)で処理し樹脂からの切り出しと側鎖保護基の除去を同時に行った。粗ペプチドを参考例12と同様の方法で精製し目的物を得た。

質量分析による(M+H)<sup>+</sup> 2568.4 (計算値2568.4)

HPLC溶出時間 21.7 分

溶出条件

カラム Wakosil-II5C18 HG (4.6 x 100mm)

溶離液 A液:0.1%TFA-水、B液: 0.1%TFA含有アセトニトリルを用い、 A/B: 10  
0 / 0 ~ 30 / 70へ 直線型濃度勾配溶出(35分)

流速 1.0ml/分

【0148】

参考例64 GPR8発現CHO細胞膜画分を用いて測定したGPR8リガンド  
ペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体のGTP $\gamma$ S結合促進活性

本明細書に合成法を記載したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモ  
ログの誘導体を種々の濃度で参考例6に記載した方法でGPR8発現CHO細胞  
膜画分に投与してGTP $\gamma$ S結合促進活性を測定した。測定した誘導体の配列番  
号とGTP $\gamma$ S結合促進活性を表1に示した。なお、活性は50%有効濃度 (EC<sub>50</sub>  
値) で示した。また、参考例20および21に記載のhGPR8L(1-23)およびhGPR8L  
(1-30)のGTP $\gamma$ S結合促進活性も合わせて記載した。

【0149】

参考例65 GPR8発現CHO細胞膜画分および [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>10</sup>]-hGPR8L(1-23)  
を用いて測定したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体  
の受容体結合活性

本明細書に合成法を記載したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモ  
ログの誘導体の受容体結合活性を参考例43に記載した方法でGPR8発現CH  
O細胞膜画分および [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>10</sup>]-hGPR8L(1-23)を用いて測定した。測定した誘  
導体の配列番号と受容体結合活性を表1に示した。なお、受容体結合活性は50%  
結合阻害濃度 (IC<sub>50</sub>値) で示した。また、参考例43に記載のhGPR8L(1-23)の受  
容体結合活性も合わせて記載した。

【0150】

【表 1】

PR8 リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体のGTP  $\gamma$  S結合促進活性および受容体結合活性

誘導体	配列番号	GTP $\gamma$ S結合促進活性 (EC <sub>50</sub> nM)	受容体結合活性 (IC <sub>50</sub> nM)
hGPR8L (1-23)	16	1.6	0.25
hGPR8L (1-30)	17	0.57	0.025
[Met (0)]-hGPR8L (1-23)	95	1.4	0.31
Fmoc-hGPR8L (1-23)	105	240	0.20
Ac-hGPR8L (1-23)	106	14	2.4
[D-Trp <sup>1</sup> ]-hGPR8L (1-23)	112	7.1	0.82
hGPR8L (2-23)	107	3900	160
Ac-hGPR8L (2-23)	111	7200	420
IndPr-hGPR8L (2-23)	113	5.0	0.28
hGPR8L (4-23)	108	6700	1400
hGPR8L (9-23)	109	4200	1300
hGPR8L (1-20)	98	0.86	0.20
hGPR8L (1-19)	99	1000	100
hGPR8L (1-18)	100	>10000	2700
pGPR8L (1-23)	56	1.5	0.38
[Met (0)]-pGPR8L (1-23)	103	0.73	0.29

## 【0151】

参考例 66 ラット全脳由来Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAのクローニングと塩基配列の決定

ラット全脳cDNA (CLONTECH) を鋳型とし、ヒトGPR8をコードするDNAの塩基配列を元に設計した2個のプライマー、プライマー1 (配列番号: 128) およびプライマー2 (配列番号: 129) を用いてPCR反応を行った。該反応における反応液の組成は、上記cDNAを10分の1量鋳型として

使用し、Advantage-2 cDNA Polymerase Mix (CLONTECH) 1/50量、プライマー3 0.2  $\mu$ M、プライマー2 0.2  $\mu$ M、dNTPs 200  $\mu$ M、および酵素に添付のバッファーを加え、25  $\mu$ lの液量とした。PCR反応は、(i) 94℃・2分の後、(ii) 94℃・20秒、72℃・2分のサイクルを3回、(iii) 94℃・20秒、66℃・20秒、68℃・2分のサイクルを3回、(iv) 94℃・20秒、60℃・20秒、68℃・2分のサイクルを36回繰り返し、最後に68℃・7分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物を、TAクローニングキット (Invitrogen) の処方に従い、プラスミドベクターpCR2.1-TOPO (Invitrogen) へサブクローニングした。これを大腸菌DH5 $\alpha$ に導入し、アンピシリンを含むLB寒天培地中で、cDNAを持つクローンを選択した。個々のクローンの配列を解析した結果、新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAの塩基配列 (配列番号: 127) を得た。このDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列 (配列番号: 126) を含有する新規Gタンパク質共役型レセプタータンパク質をTGR26と命名した (本明細書中、ラットTGR26とも称する)。

配列番号: 126で表されるアミノ酸配列は、既知のヒトGタンパク質共役型レセプタータンパク質であるGPR7 [ゲノミクス (Genomics), 28巻, 84-91頁, 1995年] との間に84.8%の相同性を有していた。

TGR26をコードするDNAを挿入したプラスミドを有する前述した形質転換体から1クローンを選択し、アンピシリンを含むLB培地で振とう培養し、プラスミドを得た。これを制限酵素ClaIおよびSpeIで処理し、TGR26をコードするインサート部分を切り出した。同様に制限酵素ClaIおよびSpeIで処理したpAKKO-1.11HおよびLigation Expression Kit (CLONTECH) を用いて連結し、大腸菌DH10Bにエレクトロポレーション法にて導入した。得られたクローンについては、有する発現細胞構築用プラスミドの構造を、制限酵素処理および配列解析で確認したうえ、大腸菌 (*Escherichia coli*) DH10B/pAK-rGPR7と命名した。

TGR26の疎水性プロット図を〔図11〕に示す。

【0152】

参考例67 TGR26発現CHO細胞の作製

参考例66に記載の発現プラスミドpAK-rGPR7で形質転換したEscherichia coli DH5 $\alpha$  (東洋紡) を培養後、Plasmid Midi Kit (キアゲン) を用いてpAK-rGPR7プラスミドDNAを調製した。これをCellPfect Transfection Kit (アマシャムファルマシアバイオテック) を用いて、添付のプロトコールに従ってCHO dhfr<sup>-</sup>細胞に導入した。5 $\mu$ gのDNAをリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、48時間前に3 $\times$ 10<sup>5</sup>個のCHO dhfr<sup>-</sup>細胞を播種した直径6cmシャーレ2枚に添加した。10%ウシ胎児血清を含むMEM $\alpha$ 培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核酸不含MEM $\alpha$ 培地で培養した。選択培地中に増殖してくるTGR26発現CHO細胞である形質転換細胞のコロニー44クローンを選択した。

【0153】

参考例68 TaqMan PCR法を用いたTGR26発現CHO細胞株のTGR26発現量の定量

参考例67で得たTGR26発現CHO細胞株44クローンを、各25cm<sup>2</sup>フラスコに培養し、RNeasy Mini Kits (キアゲン) を用いてtotal RNAを調製した後、RNase-free DNase Set (キアゲン) を用いてDNase処理をした。得られたtotal RNA 4 $\mu$ gをランダムプライマー (宝酒造) 500pmolを含む溶液12 $\mu$ lとして70℃で10分間処理した後氷冷し、さらに1 $\times$ First Strand Buffer、10 mM DTT、500 $\mu$ M dA/dC/dG/dTTPおよび200 units SUPERScript II (ギブコ) を添加し、混合液20 $\mu$ lを、30℃・10分、42℃・60分、51℃・30分、70℃・15分で処理することにより逆転写反応を行なった。得られたtotal RNA 5ng相当の逆転写産物、または後に述べるようにして作製した10から1 $\times$ 10<sup>7</sup>コピーの標準cDNA、1 $\times$ Universal PCR Master Mix (PEバイオシステムズ)、配列番号: 130で表されるプライマーお

および配列番号：131で表されるプライマー各100 nM、および配列番号：140 (Fam-tcctctgctggacaccgtac cacctga-Tamra；配列中、Famは6-carboxy-fluoresceinを、Tamraは6-carboxy-tetramethyl-rhodamineを、それぞれ示す。)で表されるTaqManプローブ100 nMを含む反応混合液25  $\mu$ lについてABI PRISM 7700 Sequence Detector (PEバイオシステムズ)を用いてPCRを行なった。PCRは、50℃・2分、95℃・10分で処理後、95℃・15秒、60℃・60秒のサイクルを40回繰り返すことにより行なった。

標準cDNAは、100 pgのTGR26発現プラスミドDNA (pAK-rGPR7)、配列番号：130で表されるプライマーおよび配列番号：131で表されるプライマー各500 nM、1xPCR Gold Buffer、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、200  $\mu$ M dA/dC/dG/dTTPおよび20 units AmpliTaq Gold (PEバイオシステムズ)を含む反応混合液200  $\mu$ lを、GeneAmp PCR System 9700 (PEバイオシステムズ)を用いて、95℃・10分で処理後、95℃・10秒、63℃・15秒、72℃・10秒のサイクルを40回繰り返す条件のPCRを行なって増幅して調製した。QIAquick PCR Purification Kit (キアゲン)を用いて精製した合成cDNAの260 nmの吸光度を測定して濃度を算出し、さらに標準cDNAの正確なコピー数を算出した後、1 mM EDTAを含む10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 溶液で希釈し、1 x 10<sup>8</sup>コピー/ $\mu$ lの濃度の標準cDNA溶液を調製した。また、TaqMan PCR用プローブおよびプライマーはPrimer Express (Version 1.0) (PEバイオシステムズ)により設計した。

発現量はABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、標準cDNAの初期濃度の対数値を横軸にとり、標準曲線を作成した。標準曲線より各逆転写産物の初期濃度を算出し、各クローンのtotal RNA当たりのTGR26遺伝子発現量を求めた。その結果、TGR26発現CHO細胞株クローン番号18および28が高い発現量を示すことがわかった。以後の実験

にはこれら2つのクローンの発現細胞を用いた。

【0154】

参考例69 TGR26発現CHO細胞を用いた細胞内cAMP産生量の測定

参考例68で作製したTGR26発現CHO細胞を24穴プレートに $5 \times 10^4$  cell/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2mM 3-イソプロピルメチルキサンチン、0.05% BSA（ウシ血清アルブミン）および20mM HEPESを含むMEM $\alpha$ バッファー（pH7.4）で洗浄した〔以下、0.2mM 3-イソプロピルメチルキサンチン、0.05% BSAおよび20mM HEPESを含むMEM $\alpha$ バッファー（pH7.4）を、反応用バッファーと呼ぶ〕。その後、0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温した。反応用バッファーを除き、新たに0.25mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、適当な濃度のDMSO溶液とした試料と2 $\mu$ Mフォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを細胞に加え、37℃で30分間反応させた。100 $\mu$ lの20%過塩素酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は、cAMP EIAキット（アマシャムファルマシアバイオテック）を用いて測定した。

【0155】

参考例70 TGR26発現CHO細胞膜画分を用いて測定した23残基または30残基のGPR8リガンドペプチドヒトホモログの細胞内cAMP産生抑制活性

参考例で得られた23残基のGPR8リガンドペプチドヒトホモログ（以下、hGPR8L（1-23）と記載することがある）または参考例で得られた30残基のGPR8リガンドペプチドヒトホモログ（以下、hGPR8L（1-30）と記載することがある）を、種々の濃度で参考例69に記載した方法でTGR26発現CHO細胞膜画分に投与し、細胞内cAMP産生抑制活性を測定した。

結果を〔図12〕に示す。

これより明らかに、hGPR8L（1-23）およびhGPR8L（1-30）は濃度依存的にTGR26発現CHO細胞細胞内cAMPの産生を抑制した。

図中、cAMP合成抑制活性は、フォルスコリンを含む反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量から反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を100%として、hGPR8L(1-23)またはhGPR8L(1-30)を加えたときの細胞内cAMP量から反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を%として表わした。

これより、hGPR8L(1-23)またはhGPR8L(1-30)が、TGR26に対するリガンドであることが明らかとなった。

hGPR8L(1-23)のブタ、ラットおよびマウスのホモログおよびhGPR8L(1-30)のブタ、ラットおよびマウスのホモログを用いても、上記と同様に、濃度依存的にTGR26発現CHO細胞細胞内cAMPの産生抑制を確認できる。

#### 【0156】

参考例71 TGR26発現CHO細胞の膜画分を用いたGTP $\gamma$ S結合活性の測定

TGR26発現CHO細胞膜画分に対する [<sup>35</sup>S] - guanosine 5' - (γ-thio) triphosphate (GTP $\gamma$ S) の結合促進活性を以下の方法により測定した。

##### 1) 膜画分の調整法

$1 \times 10^8$ 個のTGR26発現CHO細胞に10mlのホモジネートバッファー(10mM NaHCO<sub>3</sub>、5mM EDTA、0.5mM PMSF(フェニルメチルスルホニルフルオライド)、1μg/ml ペプスタチン、4μg/ml E-64、20μg/ml ロイペプチン)を添加し、ポリトロン(12,000rpm、1分間)を用いて破碎した。細胞破碎液を遠心(1,000g、15分間)して上清を得た。次にこの上清を超遠心分離(Beckman type 30ローター、30,000rpm、1時間)し、得られた沈殿物をTGR26発現CHO細胞膜画分とした。

##### 2) GTP $\gamma$ S結合活性の測定

TGR26発現CHO細胞膜画分を膜希釈緩衝液(50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)、5mM MgCl<sub>2</sub>、150mM NaCl、1μM GD



P、0.1% BSA)で希釈して、タンパク質濃度 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ のアッセイ用細胞膜面分溶液を調製した。アッセイ用膜面分溶液 $200\mu\text{l}$ に、 $50\text{nM}$ 濃度の $[\text{}^{35}\text{S}]$ -guanosine 5'-( $\gamma$ -thio) triphosphate (NEN社)を $2\mu\text{l}$ と適当な濃度のDMSO溶液とした試料 $2\mu\text{l}$ とを添加し、この混合液を $25^\circ\text{C}$ で一時間保温した。混合液をフィルター濾過し、さらにフィルターを洗浄用バッファー( $50\text{mM}$ トリス塩酸緩衝液( $\text{pH}7.4$ )、 $5\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ 、 $1\text{mM}$  EDTA、 $0.1\%$  BSA) $1.5\text{ml}$ で2回洗浄した後、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

## 【0157】

参考例72 TGR26発現CHO細胞膜面分を用いて測定した23残基または30残基のGPR8リガンドペプチドヒトホモログの $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合促進活性 hGPR8L(1-23)またはhGPR8L(1-30)を種々の濃度で、参考例71に記載した方法に従い、TGR26発現CHO細胞膜面分と混合し、 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合促進活性を測定した。

結果を【図13】に示す。

これより明らかに、hGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)は濃度依存的にTGR26発現CHO細胞膜面分の $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合を促進した。

hGPR8L(1-23)のブタ、ラットおよびマウスのホモログおよびhGPR8L(1-30)のブタ、ラットおよびマウスのホモログを用いても、上記と同様に、濃度依存的にTGR26発現CHO細胞膜面分の $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 結合促進を確認できる。

## 【0158】

参考例73  $[\text{}^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)を用いたレセプター結合実験

参考例42に記載した方法により作製した $[\text{}^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)および参考例71に記載したTGR26発現CHO細胞から調製した細胞膜面分を用いて以下のようにしてレセプター結合実験を行なった。

TGR26発現CHO細胞から調製した細胞膜面分を、アッセイ用バッファー (25 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.05% CHAPS (3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン硫酸)、0.1%BSA、0.5 mM PMSF、1  $\mu$ g/ml ペプスタチン、20  $\mu$ g/ml ロイペプチン、4  $\mu$ g/ml E-64、pH 7.4) で各種濃度に希釈後、ポリプロピレン製試験管 (Falcon2053) に200  $\mu$ l ずつ分注した。最大結合量を測定するために2  $\mu$ l のDMSOと7 nMの [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ] -hGPR8L (1-23) 2  $\mu$ l を膜面分溶液に添加した。また、非特異的結合を測定するために100  $\mu$ M hGPR8L (1-23) のDMSO溶液2  $\mu$ l と7 nMの [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ] -hGPR8L (1-23) 2  $\mu$ l を膜面分溶液に添加した。25℃で75分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマンガラスフィルター (GF-F) を用いて反応液を吸引ろ過しさらにフィルターを洗浄用バッファー (25 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.05% CHAPS, 0.1%BSA, pH 7.4) 1.5 mlで2回洗浄した。ろ過後、 $\gamma$ -カウンターを用いてろ紙上に残った放射活性を測定し、最大結合量から非特異的結合量を引いて特異的結合量を見積もった。

膜面分の濃度を変化させると膜面分の濃度に依存した [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ] -hGPR8L (1-23) の特異的な結合が認められた。膜面分濃度を3  $\mu$ g/ml に設定してhGPR8L (1-23) およびhGPR8L (1-30) による [ $^{125}$ I-Tyr $^{10}$ ] -hGPR8L (1-23) のTGR26発現細胞膜面分への特異的結合に対する結合阻害を調べた。阻害率から50%阻害濃度 (IC $_{50}$ 値) を算出したところ、hGPR8L (1-23) のIC $_{50}$ 値は0.12 nMであった。また、hGPR8L (1-30) のIC $_{50}$ 値は0.028 nMであった。

これより、hGPR8L (1-23) およびhGPR8L (1-30) がTGR26発現細胞膜面分に対して高い親和性を有することが示された。このことは、hGPR8L (1-23) およびhGPR8L (1-30) がTGR26レセプターの高親和性リガンドであることを意味するものである。

〔図14〕に種々の濃度におけるhGPR8L (1-23) およびhGPR8L (1-30) の結合阻害を示す。

hGPR8L(1-23)のラットおよびマウスのホモログおよびhGPR8L(1-30)のブタ、ラットおよびマウスのホモログを用いても、上記と同様に、 $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)のTGR26発現細胞膜画分への特異的結合に対する結合阻害を確認できる。

【0159】

参考例74 TGR26発現CHO細胞膜画分および $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)を用いて測定したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体のレセプター結合活性

参考例で得られたGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体のレセプター結合活性を、参考例73に記載した方法でTGR26発現CHO細胞膜画分および $[^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$ -hGPR8L(1-23)を用いて測定した。測定した誘導体とレセプター結合活性を表2に示す。レセプター結合活性は、50%結合阻害濃度( $\text{IC}_{50}$ 値)で示した。

【0160】

【表 2】

誘導体	受容体結合活性 (IC <sub>50</sub> nM)
[Met (O)]-hGPR8L (1-23)	0.29
Fmoc-hGPR8L (1-23)	0.23
Ac-hGPR8L (1-23)	0.27
[D-Trp <sup>1</sup> ]-hGPR8L (1-23)	1.3
hGPR8L (2-23)	240
Ac-hGPR8L (2-23)	570
IndPr-hGPR8L (2-23)	0.12
hGPR8L (4-23)	2000
hGPR8L (9-23)	2500
hGPR8L (1-20)	0.17
hGPR8L (1-19)	9.9
hGPR8L (1-18)	760
pGPR8L (1-23)	0.12
[Met (O)]-pGPR8L (1-23)	0.28

## 【0161】

参考例 75 マウス TGR26 をコードする cDNA の 5' 上流端のクローニング

5' RACE PCR クローニングによりマウス TGR26 をコードする cDNA の 5' 上流塩基配列を明らかにした。

5' RACE PCR クローニングは、参考例に記載のマウス脳 cDNA を鋳型として SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit に添付の Universal Primer Mix と配列番号 : 132 の合成プライマーで PCR 反応を行ない、次にこの PCR 反応液を鋳型としてキットに添付の Nested Universal Primer と配列番号 : 133 の合成プライマーで PCR 反応を行なうことにより達成された。配列番号 : 132 および配列番号 : 133 のプライマーは、Genbank に登録のマウス GPR7 cDNA 断片配列 (Accession: U23807) を基に設計した。PCR の反応液組成と反応条件は以下

のとおりである。反応液はマウス脳 cDNA 1  $\mu$ l、Universal Primer Mix 2  $\mu$ l、配列番号：132の合成DNAプライマー 0.2  $\mu$ M、0.8mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4  $\mu$ l および酵素に付属のバッファーで総反応量を20  $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PEバイオシステムズ) を用い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、68℃・120秒のサイクルを30回繰り返す、さらに72℃で10分間保温した。次に、キットに添付の Tricine-EDTA Bufferで50倍希釈したPCR反応液 0.5  $\mu$ l、Nested Universal Primer 0.5  $\mu$ M、配列番号：133の合成DNAプライマー 0.5  $\mu$ M、0.8mM dNTPs、Advantage-GC 2ポリメラーゼ (CLONTECH) 0.4  $\mu$ l および酵素に付属のバッファーで総反応量を20  $\mu$ lとし、サーマルサイクラー (PEバイオシステムズ) を用い、96℃・120秒の加熱の後、96℃・30秒、60℃・30秒、72℃・60秒のサイクルを30回繰り返す、さらに72℃で10分間保温した。増幅したDNAを1.5%のアガロースゲル電気泳動により分離した後、約450塩基長のDNAをカミソリで切り出し、DNAをQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて回収した。このDNAをTOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) のプロトコールに従ってpCR2.1-TOPOベクターへクローニングした。これをエシェリヒア・コリ (Escherichiacoli) TOP10 competent cell (Invitrogen) に導入して形質転換した後、cDNA挿入断片を持つクローンをアンピシリンおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell8 Plasmid Kit (キアゲン) を用いてプラスミドDNAを調整した。塩基配列の決定のための反応はBigDye Terminator CycleSequencing Ready Reaction Kit (PEバイオシステムズ) を用いて行ない、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、配列番号：134で表される塩基配列を得た。

【0162】

参考例76 ヒト染色体DNAを用いたPCR法によるヒトGPR7 DNAの増幅

ヒト染色体DNAを鋳型として、2種の合成プライマー (配列番号：141お

および配列番号：142)を用いたPCR法によるDNA増幅を行なった。合成プライマーは受容体蛋白に翻訳される領域の遺伝子が増幅されるように構築したが、その際に遺伝子の5'側に制限酵素C1a Iの認識する塩基配列が付加され、3'側に制限酵素Spe Iの認識する塩基配列が付加されるように、5'側および3'側にそれぞれの制限酵素の認識配列を付加した。反応液の組成は、ヒト染色体DNA(タカラ)0.5 $\mu$ g、合成DNAプライマー各1 $\mu$ M、0.8 mM dNTPs、1 mM MgCl<sub>2</sub>、KODポリメラーゼ(トーヨーボ-ー)1 $\mu$ lおよび酵素に付属のパufferで、総反応量は50 $\mu$ lとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー(タカラ)を用い、94 $^{\circ}$ C・60秒の加熱の後、98 $^{\circ}$ C・15秒、65 $^{\circ}$ C・2秒、74 $^{\circ}$ C・30秒のサイクルを35回繰り返した。増幅産物の確認は、0.8%アガロースゲル電気泳動の後、エチジウムブロマイド染色によって行なった。

## 【0163】

参考例77 PCR産物のプラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入DNA部分の塩基配列の解読による増幅DNA配列の確認

参考例76で行なったPCR反応液を0.8%の低融点アガロースゲル電気泳動により分離し、バンドの部分をかみそりで切り出した後、細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿の操作を行なってDNAを回収した。PCR-Script<sup>TM</sup> Amp SK(+)クローニングキット(ストラタジーン)の処方に従い、回収したDNAをプラスミドベクターpCR-Script Amp SK(+)へサブクローニングした。これをエシェリヒア コリ(Escherichiacoli) DH5 $\alpha$  competent cell(トーヨーボ-ー)に導入して形質転換した後、DNA挿入断片を持つクローンをアンピシリン、IPTGおよびX-galを含むLB寒天培地で選択し、白色を呈するクローンのみを滅菌したつま楊枝を用いて分離し、形質転換体E.coli DH5 $\alpha$ /GPR7を得た。個々のクローンをアンピシリンを含むLB培地で一晚培養し、QIAwell 8 Plasmid Kit(キアゲン)を用いてプラスミドDNAを調整した。調整したDNAの一部に対して制限酵素ClaIおよびSpe Iによる切断を行ない、挿入されている受容体DNA断片の大きさを確認した。塩基配列の決定のための反応はDyeDeoxyTerminatorCycle Sequence Kit(Applied Biosystems社)を用いて行ない、蛍光式自動シーケン

サーを用いて解読した（配列番号：143）。配列番号：143で表される塩基配列を有するDNAを保持するpCR-ScriptAmp SK(+)プラスミドを、pCR-ScriptヒトGPR7と命名した。配列番号：143で表される塩基配列を有するDNAがコードするヒトGPR7のアミノ酸配列を配列番号：144に示した。ここで配列を決定したヒトGPR7のDNA配列はO' Dowdらの報告（O' Dowd, B. F. et al., Genomics, 28巻、84-91頁、1995年）にあるDNA配列とは2塩基が異なっていた。これらは配列番号：143の893番目および894番目に当たり、O' Dowdらの報告ではそれぞれCおよびGであるが、本参考例ではGおよびCであった。これにより、翻訳されるアミノ酸配列において配列番号：144の296番目のアミノ酸が、O' Dowdらの報告のThrが本参考例ではSerとなる。

#### 【0164】

#### 参考例78 ヒトGPR7発現CHO細胞の作製

参考例77で配列が確認されたヒトGPR7の全長アミノ酸配列をコードし5'側にCla I認識配列を付加し、また3'側にSpe I認識配列を付加した遺伝子が導入されたプラスミドによって形質転換されたE.coliのクローンからPlasmid Midi Kit（キアゲン）を用いてプラスミドDNAを調整し、これを制限酵素Cla IおよびSpe Iで消化してインサートDNAを切り出した。インサートDNAは電気泳動後、アガロースゲルからカミソリで切り出し、次に細片化、フェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈殿の操作により回収された。このインサートDNAをCla IおよびSpe Iで切断した動物細胞発現用ベクタープラスミドpAKK0-111H（Hinuma, S. et al. Biochim. Biophys. Acta, 1219巻、251-259頁、1994年、記載のpAKK01.11Hと同一のベクタープラスミド）に加え、T4ライゲース（タカラ）を用いてライゲーションを行ない、蛋白発現用プラスミドpAKK0-HumanGPR7を構築した。このプラスミドpAKK0-Human GPR7で形質転換した大腸菌をDH5 $\alpha$ /pAKK0-Human GPR7と命名した。

pAKK0-HumanGPR7で形質転換したE. coli DH5 $\alpha$ （トーヨーボー）を培養後、Plasmid Midi Kit（キアゲン）を用いてpAKK0-Human GPR7プラスミドDNAを調整した。これをCellPfectTransfection Kit（アマシャムファルマシアバイオテック）を用いて、添付のプロトコールに従ってCHO dhfr<sup>-</sup>細胞に導入した。3 $\mu$ gの DN

Aをリン酸カルシウムとの共沈懸濁液とし、24時間前に $5 \times 10^5$ または $1 \times 10^6$ 個のCHO dhfr<sup>-</sup>細胞を播種した直径6 cmシャーレに添加した。10%ウシ胎児血清を含むMEM $\alpha$ 培地で1日間培養した後、継代し、選択培地である10%透析ウシ胎児血清を含む核酸不含MEM $\alpha$ 培地で培養した。選択培地中に増殖してくるGPR8発現CHO細胞である形質転換細胞のコロニー24クローンを選択した。

【0165】

参考例79 TaqMan PCR法を用いたヒトGPR7発現CHO細胞株のヒトGPR7遺伝子発現量の測定

参考例78に従って作製したヒトGPR7発現CHO細胞株24クローンを各25cm<sup>2</sup>フラスコに培養し、増殖した細胞からISOGEN（ニッポンジーン社）を用いてtotal RNA画分を調製した。このtotal RNA画分に対してMessageClean(Gen Hunter社)キットを用いたDNase I処理を行ない、DNAを含まないtotal RNAを得た。

Total RNAを鋳型としたcDNA合成は、TaqManReverse Transcription Reagents (Applied Biosystems 社)キットを用いて行なった。反応液の組成は、DNaseI処理したtotal RNA 4 $\mu$ g、ランダムプライマー1 $\mu$ l、25 mM MgCl<sub>2</sub>溶液4.4 $\mu$ l、10 mM dNTP mix 2 $\mu$ l、RNaseInhibitor 0.4 $\mu$ l、逆転写酵素0.5 $\mu$ lおよびキットに付属の反応バッファーで、総反応量を20 $\mu$ lとした。逆転写反応はサーマルサイクラー（タカラ）を用いて、25℃・10分、48℃・30分、95℃・5分の条件で行なった。

標準ヒトGPR7 DNAは、全長ヒトGPR7DNAを鋳型としたPCR増幅DNAを精製することにより調製された。PCR反応液の組成は、参考例77に記載のpCR-ScriptヒトGPR7 5pg、合成DNAプライマー（配列番号：145）0.5 $\mu$ M、合成DNAプライマー（配列番号：146）0.5 $\mu$ M、1.6mM dNTPs、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、LATAqポリメラーゼ（タカラ）0.5 $\mu$ lおよび酵素に付属のバッファーで、総反応量は50 $\mu$ lとした。増幅のための反応はサーマルサイクラー（AppliedBiosystems 社）を用い、94℃・120秒の加熱の後、94℃・30秒、60℃・30秒、72℃・60秒のサイクルを25回繰り返し、最後に72℃・10分間保温した。PCR反応液を0.8%のアガロースゲル電気泳動により分離し、バンドの部分をかみそりで切り出した後、QIAquickPCR Purification Kit（キアゲン）を用いてPCR増幅DNAを回収した。このPCR増幅DNA溶液



に混入しているプライマーDNAおよびdNTPsを取り除くため、このDNA溶液をクロモスピンカラム400 (CLONTECH社)ゲルクロマトグラフィーに供し、増幅ヒトGPR7DNA溶出画分を得た。この増幅ヒトGPR7 DNA溶液の260 nmの吸収から計算されたDNA量と増幅ヒトGPR7 DNA塩基組成から、本増幅ヒトGPR7DNA溶液に含まれるDNAのコピー数が算出された。このDNAコピー数が明らかとなった増幅ヒトGPR7 DNAを標準ヒトGPR7 DNAとして、定量を目的としたTaqManPCRに用いることにした。

## 【0166】

ヒトGPR7CHO細胞株の発現ヒトGPR7遺伝子コピー数は、TaqManPCR法により決定された。TaqMan PCR反応液の組成は、蒸留水で100倍希釈した逆転写cDNA溶液1 $\mu$ lまたは種々のコピー数の標準ヒトGPR7 DNA溶液1 $\mu$ l、合成DNAプライマー（配列番号：147）0.2 $\mu$ M、合成DNAプライマー（配列番号：148）0.2 $\mu$ M、ヒトGPR7 TaqManプローブ〔配列番号：77（Fam-TTCATCCTCA ACCTGGCCAT CGC-Tamra；配列中、Famは6-carboxy-fluoresceinを、Tamraは6-carboxy-tetramethyl-rhodamineを、それぞれ示す。）で表される塩基配列を有するプローブ〕0.2 $\mu$ MおよびTaqManUniversal PCR Master Mix(Applied Biosystems社)で、総反応量を25 $\mu$ lとした。PCR反応は、ABI PRISM7700 Sequence Detector System (Applied Biosystems社)を用い、50℃・2分、95℃・10分で保温し、次に95℃・15秒、60℃・60秒のサイクルを40回繰り返すことにより行なった。ヒトGPR7遺伝子発現量はABI PRISM 7700 SDSソフトウェアによって算出した。リポーターの蛍光強度が、設定された値に達した瞬間のサイクル数を縦軸にとり、種々の標準ヒトGPR7DNAのコピー数の対数値を横軸にとって標準曲線を作成した。標準曲線より逆転写cDNAに含まれるヒトGPR7 cDNAのコピー数を算出し、total RNA1ng当たりのヒトGPR7遺伝子発現量を決定した。ヒトGPR7遺伝子発現量の高いクローンNo. 7, 8および14を、ヒトGPR7遺伝子高発現細胞株として選択した。

## 【0167】

参考例80 ヒトGPR7発現CHO細胞を用いた細胞内cAMP産生量の測定

参考例78で作製し、参考例79に記載したようにして選択したヒトGPR7発現CHO細胞を24穴プレートに5 x 10<sup>4</sup> cell/wellで播種し、48時間培養した。細胞を0.2mM 3-イソブチルメチルキサンチン、0.05% BSA（ウシ血清アルブミン）

および20 mM HEPESを含むMEM $\alpha$ バッファー(pH7.4)で洗浄した(以下、0.2mM 3-イソブチル-L-メチルキサンチン、0.05% BSAおよび20 mM HEPESを含むMEM $\alpha$ バッファー(pH7.4)を、反応用バッファーと呼ぶ)。その後0.5mlの反応用バッファーを加えて30分間培養器で保温した。反応用バッファーを除き、新たに0.25 mlの反応用バッファーを細胞に加えた後、適当な濃度のDMSO溶液とした試料と2 $\mu$ M フォルスコリンを含む0.25mlの反応用バッファーを細胞に加え、37℃で30分間反応させた。100 $\mu$ lの20%過塩素酸を加えて反応を停止させ、次に氷上で1時間置くことにより細胞内cAMPを抽出した。抽出液中のcAMP量は、cAMP EIAキット(アマシャムファルマシアバイオテク)を用いて測定した。

#### 【0168】

参考例81 ヒトGPR7発現CHO細胞を用いて測定した23残基または30残基のGPR8リガンドペプチドヒトホモログの細胞内cAMP産生抑制活性

hGPR8L(1-23)またはhGPR8L(1-30)を種々の濃度で、参考例80に記載した方法に従い、ヒトGPR7発現CHO細胞に投与して細胞内cAMP産生抑制活性を測定した。結果を図15に示す。図中、cAMP合成抑制活性は、フォルスコリンを含む反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量から反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を100%として、hGPR8L(1-23) またはhGPR8L(1-30)を加えたときの細胞内cAMP量から反応用バッファーを添加したときの細胞内cAMP量を減じた量を%として表わした。

明らかにhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)は濃度依存的にヒトGPR7発現CHO細胞細胞内cAMPの産生を抑制した。このことからhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)が、ヒトGPR7に対するリガンドであることが明らかとなった。cAMP産生量から50%阻害濃度(IC<sub>50</sub>値)を算出したところ、hGPR8L(1-23)のIC<sub>50</sub>値は0.025 nMであった。また、hGPR8L(1-30)のIC<sub>50</sub>値は0.13 nMであった。

hGPR8L(1-23)のブタ、ラットおよびマウスのホモログおよびhGPR8L(1-30)のブタ、ラットおよびマウスのホモログを用いても、上記

と同様にヒトGPR7発現CHO細胞の反応を確認できる。

【0169】

参考例82  $[^{125}\text{I}-\text{Tyr}^{10}] - \text{hGPR8L} (1-23)$  を用いた受容体結合実験

参考例42に記載した方法により作製した  $[^{125}\text{I}-\text{Tyr}^{10}] - \text{hGPR8L} (1-23)$  およびヒトGPR7発現CHO細胞から調製した細胞膜面分を用いて受容体結合実験を行なった。

最初に膜面分の調整法を以下に記載する。

$1 \times 10^8$ 個のヒトGPR7発現CHO細胞に10mlのホモジネートバッファ（10mM  $\text{NaHCO}_3$ 、5mM EDTA（エチレンジアミン四酢酸）、0.5mM PMSF（フェニルメタンスルホニルフルオリド）、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ペプスタチン、 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  E64、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  ロイペプチン）添加し、ポリトロン（12,000rpm、1分間）を用いて破碎した。細胞破碎液を遠心（1,000g、15分間）して上清を得た。次にこの上清を超遠心分離（Beckman type 30ローター、30,000rpm、1時間）し、得られた沈殿物をヒトGPR7発現CHO細胞膜面分とした。

かくして調製された細胞膜面分を、アッセイ用バッファ（25mM  $\text{Tris-HCl}$ 、5mM EDTA、0.05% CHAPS（3-〔（3-コラミドプロピル）ジメチルアンモニオ〕-1-プロパン硫酸）、0.1% BSA、0.5mM PMSF、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  ペプスタチン、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  ロイペプチン、 $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  E-64、pH7.4）で各種濃度に希釈後、ポリプロピレン製試験管（Falcon 2053）に $200 \mu\text{l}$ ずつ分注した。最大結合量を測定するために $2 \mu\text{l}$ のDMSOと8 nMの  $[^{125}\text{I}-\text{Tyr}^{10}] - \text{hGPR8L} (1-23)$   $2 \mu\text{l}$ を膜面分溶液に添加した。また、非特異的結合を測定するために1mM hGPR8L（1-23）のDMSO溶液 $2 \mu\text{l}$ と8 nMの  $[^{125}\text{I}-\text{Tyr}^{10}] - \text{hGPR8L} (1-23)$   $2 \mu\text{l}$ を膜面分溶液に添加した。25℃で75分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマングラスフィルター（GF-F）を用いて反応液を吸引ろ過しさらにフィルターを洗浄用バッファ（25mM  $\text{Tris-HCl}$ 、5mM EDTA、

0.05% CHAPS、0.1% BSA、pH7.4) 1.5mlで2回洗浄した。その後、 $\gamma$ -カウンターを用いてろ紙上に残った放射活性を測定し、最大結合量から非特異的結合量を引いて特異的結合量を見積もった。

膜画分の濃度を変化させると膜画分の濃度に依存した [ $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{10}$ ] - hGPR8L (1-23) の特異的な結合が認められた。膜画分濃度を10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に設定してhGPR8L (1-23) および hGPR8L (1-30) による [ $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{10}$ ] - hGPR8L (1-23) のヒトGPR7発現細胞膜画分への特異的結合に対する結合阻害を調べた。阻害率から50%阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$ 値) を算出したところ、hGPR8L (1-23) の  $\text{IC}_{50}$ 値は0.099 nMであった。また、hGPR8L (1-30) の  $\text{IC}_{50}$ 値は0.025 nMであった。

これより、hGPR8L (1-23) およびhGPR8L (1-30) がヒトGPR7発現細胞膜画分に対して高い親和性を有することが示された。このことは、hGPR8L (1-23) およびhGPR8L (1-30) がヒトGPR7受容体の高親和性リガンドであることを意味するものである。図16に、種々の濃度におけるhGPR8L (1-23) および hGPR8L (1-30) の結合阻害を示す。

hGPR8L (1-23) のラットおよびマウスのホモログおよびhGPR8L (1-30) のブタ、ラットおよびマウスのホモログを用いても、上記と同様に [ $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{10}$ ] - hGPR8L (1-23) のヒトGPR7発現細胞膜画分への特異的結合に対する結合阻害を確認できる。

【0170】

#### 参考例83

##### 1) GPR7発現CHO細胞の膜画分を用いたGTP $\gamma$ S結合活性の測定

GPR7発現CHO細胞膜画分に対する [ $^{35}\text{S}$ ] - guanosine 5' - ( $\gamma$ -thio) triphosphate (GTP $\gamma$ S) の結合促進活性を以下の方法により測定した。

参考例82に記載の方法により調製したGPR7発現CHO細胞膜画分を膜希釈緩衝液 (50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4)、5 mM  $\text{MgCl}_2$ 、

150 mM NaCl、1  $\mu$ M GDP、0.1% BSA)で希釈して、タンパク質濃度30  $\mu$ g/mlのアッセイ用細胞膜面分溶液を調製した。アッセイ用膜面分溶液200  $\mu$ lに、50 nM濃度の [<sup>35</sup>S]-guanosine 5'-( $\gamma$ -thio) triphosphate (NEN社)を2  $\mu$ lと適当な濃度のDMSO溶液とした試料2  $\mu$ lとを添加し、この混合液を25℃で一時間保温した。混合液をフィルター濾過し、さらにフィルターを洗浄用バッファー(50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.4)、5 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM EDTA、0.1% BSA) 1.5 mlで2回洗浄した後、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。

2) GPR7発現CHO細胞膜面分を用いて測定したhGPR8L(1-23)またはhGPR8L(1-30)のGTP $\gamma$ S結合促進活性

hGPR8L(1-23)またはhGPR8L(1-30)を種々の濃度で、上記1)に記載した方法に従い、GPR7発現CHO細胞膜面分に投与し、GTP $\gamma$ S結合促進活性を測定した。

結果を図17に示す。

これより明らかに、hGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)は濃度依存的にGPR7発現CHO細胞膜面分のGTP $\gamma$ S結合を促進した。

GTP $\gamma$ S結合促進活性から50%有効濃度(EC<sub>50</sub>値)を算出したところ、hGPR8L(1-23)のEC<sub>50</sub>値は0.74 nMであった。また、hGPR8L(1-30)のEC<sub>50</sub>値は0.67 nMであった(表3)。

hGPR8L(1-23)のラットおよびマウスのホモログおよびhGPR8L(1-30)のブタ、ラットおよびマウスのホモログを用いても、上記と同様にヒトGPR7発現CHO細胞の反応を確認できる。

【0171】

参考例84 GPR7発現CHO細胞膜面分を用いて測定したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体のGTP $\gamma$ S結合促進活性

参考例で得られたGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体を、種々の濃度で、参考例83に記載した方法でGPR7発現CHO細胞膜面分に投与し、GTP $\gamma$ S結合促進活性を測定した。

測定した誘導体およびGTP $\gamma$ S結合促進活性を表3に示す。活性は、50%有効濃度(EC<sub>50</sub>値)で示した。

【0172】

【表3】

GPR8 リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体のGTP $\gamma$ S結合促進活性および受容体結合活性

誘導体	GTP $\gamma$ S 結合促進活性 (EC <sub>50</sub> nM)	受容体結合活性 (IC <sub>50</sub> nM)
hGPR8L(1-23)	0.74	0.072
hGPR8L(1-30)	0.67	0.025
[Met(0)]-hGPR8L(1-23)	1.6	0.17
Fmoc-hGPR8L(1-23)	6.6	0.14
Ac-hGPR8L(1-23)	1.5	0.077
[D-Trp <sup>1</sup> ]-hGPR8L(1-23)	2.3	0.63
hGPR8L(2-23)	7410	140
Ac-hGPR8L(2-23)	7000	570
IndPr-hGPR8L(2-23)	0.85	0.044
hGPR8L(4-23)	>10000	1200
hGPR8L(9-23)	>10000	2200
hGPR8L(1-20)	0.88	0.094
hGPR8L(1-19)	84	1.7
hGPR8L(1-18)	6200	2400
pGPR8L(1-23)	0.35	0.066
[Met(0)]-pGPR8L(1-23)	1.2	0.22

【0173】

参考例85 GPR7発現CHO細胞膜面分および [<sup>125</sup>I-Tyr<sup>10</sup>]-hGPR8L(1-23)を用いて測定したGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導体の受容体結合活性

参考例で得られたGPR8リガンドペプチドのヒトおよびブタホモログの誘導

体の受容体結合活性を、参考例 82 に記載した方法で GPR7 発現 CHO 細胞膜画分および [ $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{10}$ ]-hGPR8L (1-23) を用いて測定した。

測定した誘導体のおよび受容体結合活性を表 3 に示す。受容体結合活性は 50 % 結合阻害濃度 ( $\text{IC}_{50}$  値) で示した。

【0174】

#### 実施例 1

hGPR8L (1-23) の皮下への持続投与によるラット摂餌量および体重増加に対する作用

##### (1) 摂餌量および体重増加に対する作用

Wistar 雄性ラット (8 週齢、日本チャールズリバー) を 1 週間ほど MF 粉末食 (オリエンタル酵母 (株)) で馴化した。生理食塩水に 1mM 濃度で溶解した hGPR8L (1-23) [ヒト GPR8 リガンド (1-23)] または vehicle 群として生理食塩水を 200  $\mu\text{l}$  充填した浸透圧ポンプ (alzet, MINI-OSMOTIC PUMP Model 2001, 放出速度; 24  $\mu\text{l}$  /day) をペントバルビタール麻酔下の上記ラットの皮下 (背中中央) に装着した (各  $n=6$ )。装着日の翌日を 0 日目とし、MF 粉末食を自由摂食下 8 日目まで毎日 8 時と 20 時に餌の量と体重を測定した。8 時から 20 時を明期、20 時から翌朝 8 時を暗期とした。8 日目の 8 時に測定後断頭屠殺し、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、精巣、腎臓周囲の脂肪、性器周囲の脂肪および褐色脂肪の重量を測定した。動物は全て明期周期 12 時間 (明: 8 時から 20 時) で飼育した。

摂餌量は、明期では両群での差が見られなかったが、暗期では hGPR8L (1-23) 投与群は vehicle 群に比較していずれの測定時点においても減少傾向が見られ (図 18 および 19)、1 日の摂餌量の総量で減少が見られた (図 20)。体重 (平均値  $\pm$  標準誤差) は、投与 2 日目以降から徐々に差が広がり投与 7 日目において vehicle 群 378.4  $\pm$  5.8 g に対して hGPR8L (1-23) 投与群は 364.6  $\pm$  6.0 g であった (図 21)。また、0 日目から 7 日目までの体重の増加量は vehicle 群 39.6  $\pm$  4.1 g に対して hGPR8L (1-23) 投与群は 28.9  $\pm$  3.2 g であり、hGPR8L (1-23) の 1 週間の皮下の持続投与により体重の増加が約 10.7g 抑制された (図 22)。

投与 8 日目の臓器重量を比較すると、vehicle 群と比較して hGPR8L (1-23) 投与群

では、肝臓 (1.6gの減少) ならびに白色脂肪組織である腎臓周囲脂肪 (1.2 gの減少) および性器周囲脂肪 (0.7 gの減少) においてそれぞれ0.5 g以上の減少がみられた (表4)。

【表4】

## 投与8日目の臓器重量

	Vehicle 群(g)	GPR8 リガンド(1-23)群 (g)
肝臓	15.8 ± 0.2	14.2 ± 0.7
腎臓	2.8 ± 0.09	2.6 ± 0.09
心臓	1.2 ± 0.03	1.1 ± 0.04
脾臓	1.0 ± 0.02	1.0 ± 0.06
精巣	3.7 ± 0.14	3.4 ± 0.12
腎臓周囲脂肪	5.0 ± 0.29	3.8 ± 0.53
性器周囲脂肪	6.2 ± 0.26	5.5 ± 0.38
褐色脂肪	0.32 ± 0.03	0.45 ± 0.05

(平均値 ± 標準誤差、n=6)

以上の結果からhGPR8L(1-23)の皮下投与によって摂餌量の減少および脂肪重量の低下を伴う体重増加抑制効果が認められた。

(2) 血中グルコース、総コレステロールおよびトリグリセリドに対する作用

上記(1)のhGPR8L(1-23)投与群およびvehicle群の投与8日目の血中グルコース、総コレステロールおよびトリグリセリドを富士ドライケムを用いて測定した。血中グルコース濃度 (vehicle群; 150 ± 4.9 mg/dl, hGPR8L(1-23)投与群; 155 ± 4.5 mg/dl) および血中総コレステロール濃度 (vehicle群; 73.6 ± 2.4mg/dl, hGPR8L(1-23)投与群; 69.1 ± 1.8 mg/dl) に両群の差は認められなかったが、血



中トリグリセリド濃度 (vehicle群;  $168 \pm 8.9$  mg/dl, hGPR8L(1-23)投与群;  $134 \pm 28$  mg/dl) は、hGPR8L(1-23)投与群において30mg/dl以上の低値を示した (図 23)。

以上の結果から、hGPR8L(1-23)の皮下投与によって血中トリグリセリド濃度の低下が認められた。

【0175】

#### 実施例 2

hGPR8L (1-23) の腹腔内投与によるラットの摂餌量および体重に対する作用

実施例 1 と同様にWistar雄性ラット (8週齢、日本チャールスリバー) を1週間ほどMF粉末食 (オリエンタル酵母 (株)) で馴化した。生理食塩水に0.2mg/mlおよび2 mg/ml濃度で溶解したhGPR8L(1-23) [ヒトGPR 8リガンド(1-23)] またはvehicle群として生理食塩水を1ml/kgの割合で暗期の開始直前(19時45分から20時)に腹腔内投与を3日間行なった (各n=10)。投与翌日の朝8時に摂餌量および体重を測定した。動物は全て8時から20時を明期、20時から翌朝8時を暗期とした明期周期12時間で飼育した。

摂餌量は、hGPR8L(1-23)投与群において用量依存的に減少傾向を示し、2mg/kg投与群では、投与後3日ともvehicle群と比較して有意な ( $p < 0.05$  または  $p < 0.01$ ) 減少を示した (図 24)。

体重増加量は、2 mg/kg投与群において3日ともvehicle群と比較して減少傾向を示した (平均値の差; 1日目; 1.2 g, 2日目; 3.1 g, 3日目; 2.3 g) (図 25)。

以上の結果から、hGPR8L(1-23)は、腹腔内投与により暗期での摂餌量の減少および体重増加抑制効果が認められた。

【0176】

#### 実施例 3

[Phe<sup>2</sup>] ヒトGPR8リガンド (1-20) : Trp-Phe-Lys-His-Val-Ala-Ser-Pro-Arg-Tyr-His-Thr-Val-Gly-Arg-Ala-Ala-Gly-Leu-Leu (配列番号: 149) の製造

アプライドバイオシステムズ社のペプチド自動合成機 (ABI 433 モデル) を使用し、プログラムに従ってC端より逐次Fmoc法によりペプチド鎖を延長し目的の保護ペプチド樹脂の合成を行った。

出発アミノ酸樹脂担体はWang (p-benzyloxybenzyl alcohol) 樹脂 (0.25 mmol) を使用し、Fmoc-Leu、Fmoc-Gly、Fmoc-Ala、Fmoc-Arg(Pbf)、Fmoc-Val、Fmoc-Thr( $\text{Bu}^t$ )、Fmoc-His(Trt)、Fmoc-Tyr( $\text{Bu}^t$ )、Fmoc-Pro、Fmoc-Ser( $\text{Bu}^t$ )、Fmoc-Lys(Boc)、Fmoc-Phe、Fmoc-Trp(Boc)のFmocアミノ酸誘導体をHBTU (2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロホスフェート) によりシークエンスにしたがって逐次縮合した。

樹脂上へのペプチドの構築が終了後、保護ペプチド樹脂を乾燥した。得られた保護ペプチドの脱保護処理とペプチドの樹脂担体からの切り離しはTFA処理によって行なった。得られた粗ペプチドは0.1% TFA水によって抽出し、凍結乾燥により粉末固体として得た。続いて、粗ペプチドを逆相高速クロマトグラフィー (島津製作所、分取装置:モデルLC8A) によりアセトニトリル-0.1%TFA水の系 (15-35%, 80分) を用いて分取精製を行なって目的とする精製ペプチド35 mgを得た。

精製物を0.2% 3-(2-アミノエチル) インドールを含む4N メタンスルホン酸によって110℃・22時間の条件で加水分解して得た加水分解物のアミノ酸分析値は (括弧内は理論値) 以下のとおり。

Thr (1) 0.93, Ser (1) 0.92, Gly (2) 2.03, Ala (3) 3.09, Val (2) 1.90, Leu (2) 2.02, Tyr (1) 1.02, Phe (1) 1.00, His (2) 1.91, Lys (1) 0.98, Trp (1) 0.88, Arg (2) 2.06, Pro (1) 1.02

純度はHPLCにより98.8%と算出された。また、質量分析値は2266.6 (理論値2266.6) であった。

【0177】

#### 実施例4

ラクトパーオキシダーゼ法を用いた [ $\text{Phe}^2$ ,  $^{125}\text{I}$ -Tyr $^{10}$ ] ヒトGPR8リガンド (1-20) の作製

DMSO 10  $\mu\text{l}$  に溶かした、実施例3に記載した製法に準じて得られた [ $\text{Phe}^2$ ] ヒト

GPR8リガンド(1-20) (配列番号: 149) 10 nmolを、0.1 M塩化ニッケル水溶液 10  $\mu$ l、0.1M HEPES (pH 7.6)に溶かした0.001%過酸化水素水10  $\mu$ l、0.1 M HEPES (pH 7.6)に溶かしたラクトパーオキシダーゼ (シグマ社)10  $\mu$ g/mlを10  $\mu$ l、および [ $^{125}$ I] NaI 40 MBq (NENライフサイエンスプロダクツ社) 10  $\mu$ lを混合して室温で50分間反応させた後、生成した [ $\text{Phe}^2, ^{125}\text{I-Tyr}^{10}$ ] ヒトGPR8リガンド(1-20)を以下の条件のHPLCにより分取した。

用いたカラムは、ODS-80TM (4.6 mm x 15 cm) (トーソー社)、溶出液Aとして10%アセトニトリル/0.1% TFA、溶出液Bとして60%アセトニトリル/0.1%TFAを用い、0-0 (2 min)、0-27 (5 min)、27-32 (40 min) %B/A+Bのグラディエント溶出法を行なった。流速は1mL/min、カラム温度は40℃、検出は215 nmとした。このHPLC条件では、 [ $\text{Phe}^2, ^{125}\text{I-Tyr}^{10}$ ] ヒトGPR8リガンド(1-20)は25分付近に溶出した。

【0178】

#### 実施例 5

[ $\text{Phe}^2, ^{125}\text{I-Tyr}^{10}$ ] ヒトGPR8リガンド (1-20) を用いた受容体結合実験

実施例 4 に記載した方法によって作製した [ $\text{Phe}^2, ^{125}\text{I-Tyr}^{10}$ ] ヒトGPR8リガンド(1-20)、参考例 8 2 に記載した方法により調製されたGPR 7発現CHO細胞膜面分および参考例 6 に記載した方法により調製されたGPR 8発現CHO細胞膜面分を用いて受容体結合実験を行なった。

GPR 7発現CHO細胞およびGPR 8発現CHO細胞から調製した細胞膜面分をアッセイ用バッファー (25 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.05% CHAPS, 0.1% BSA, 0.5 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml ペプスタチン, 4  $\mu$ g/ml E-64, 20  $\mu$ g/ml ロイペプチン, pH 7.4) で各種濃度に希釈後、ポリプロピレン製試験管 (Falcon 2053) に200  $\mu$ lずつ分注した。最大結合量を測定するために、2  $\mu$ lのDMSOおよび7nMの [ $\text{Phe}^2, ^{125}\text{I-Tyr}^{10}$ ] ヒトGPR8リガンド(1-20) 2  $\mu$ lを膜面分溶液に添加した。また、非特異的結合を測定するために100  $\mu$ MヒトGPR8リガンド (1-23) のDMSO溶液2  $\mu$ lおよび7 nMの [ $\text{Phe}^2, ^{125}\text{I-Tyr}^{10}$ ] ヒトGPR8リガンド(1-20) 2  $\mu$ lを膜面分溶液に添加した。25℃で75分間反応させた後、ポリエチレンイミン処理したワットマングラスフィルター (GF-F) を用いて反応液を吸引ろ過した。ろ過後、 $\gamma$ -カウン

ターを用いて濾紙上に残った放射活性を測定し、最大結合量から非特異的結合量を引いて特異的結合量を見積もった。膜画分の濃度を変化させると膜画分の濃度に依存した  $[\text{Phe}^2, ^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$  ヒトGPR8リガンド(1-20)の特異的な結合が認められた。

被験試料のGPR7受容体またはGPR8受容体に対する結合阻害活性(阻害率(%))は、最大結合量(TB)から被験試料および  $[\text{Phe}^2, ^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$  ヒトGPR8リガンド(1-20)を加えたときに濾紙上に残った放射活性(X)を減じた値の特異的結合量(SB)に対する比率  $((\text{TB}-\text{X})/\text{SB} \times 100 (\%))$  で示される。

GPR7発現CHO細胞から調製した膜画分について膜画分濃度を  $15 \mu\text{g}/\text{mL}$  に設定して阻害率からヒトGPR8リガンド(1-23)およびヒトGPR8リガンド(1-30)の50%阻害濃度( $\text{IC}_{50}$ 値)を算出したところ、 $\text{IC}_{50}$ 値はそれぞれ  $0.13 \text{ nM}$  および  $0.039 \text{ nM}$  であった。図26に種々の濃度におけるヒトGPR8リガンド(1-23)およびヒトGPR8リガンド(1-30)の結合阻害活性を示す。GPR8発現CHO細胞から調製した膜画分について膜画分濃度を  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  に設定して阻害率からヒトGPR8リガンド(1-23)およびヒトGPR8リガンド(1-30)の50%阻害濃度( $\text{IC}_{50}$ 値)を算出したところ、 $\text{IC}_{50}$ 値はそれぞれ  $0.19 \text{ nM}$  および  $0.037 \text{ nM}$  であった。図27に種々の濃度におけるヒトGPR8リガンド(1-23)およびヒトGPR8リガンド(1-30)の結合阻害活性を示す。

【0179】

#### 【発明の効果】

本発明のDNAまたは本発明のポリペプチドは、例えば体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬、摂食抑制薬または体重増加薬などのスクリーニングに、あるいは、体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制剤、体重増加剤として有用である。本発明のポリペプチドと本発明の受容体を用いるスクリーニングで得られる体重増加抑制薬、体重減少薬、脂肪量増加抑制薬、摂食抑制薬は、安全で優れた体重増加抑制剤、体重減少剤、脂肪量増加抑制剤、摂食抑制作用剤としてとして用いられる。

#### 【配列表】

[SequenceListing]

<110>Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120>Inhibitor of body weight gain

<130>B02106

<150>JP2001-403260

<151>2001-12-28

<160>149

<210>1

<211>32

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>1

atcgattaca atgcaggccg ctgggcaccc ag 32

<210>2

<211>32

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>2

actagtgcc ttcagcaccg caatatgctg cg 32

<210>3

<211>1023

<212>DNA

<213>Human

<400>3

atcgattaca atgcaggccg ctgggcaccc agagcccctt gacagcaggg gctccttctc 60

cctccccacg atgggtgcc aagtctctca ggacaatggc actggccaca atgccacctt 120

特2002-093096

ctccgagcca ctgccgttcc tctatgtgct cctgcccgcc gtgtactccg ggatctgtgc 180  
tgtggggctg actggcaaca cggccgtcat ccttgtaatc ctaagggcgc ccaagatgaa 240  
gacggtgacc aacgtgttca tctgaacct ggccgtcgcc gacgggctct tcacgttgt 300  
actgcccgtc aacatcgagg agcacctgct gcagtactgg cccttcgggg agctgctctg 360  
caagctgggtg ctggccgtcg accactacaa catcttctcc agcatctact tcctagccgt 420  
gatgagcgtg gaccgatacc tgggtgtgct ggccaccgtg aggtcccgcc acatgccctg 480  
gcgcacctac cggggggcga aggtcgccag cctgtgtgtc tggctgggcg tcacggtcct 540  
ggttctgccc ttcttctctt tcgtggcgt ctacagcaac gagctgcagg tcccaagctg 600  
tgggctgagc ttcccgtggc ccgagcaggt ctggttcaag gccagccgtg tctacacgtt 660  
ggctctgggc ttctgtctgc ccgtgtcac catctgtgtg ctctacacag acctctgcg 720  
caggctgcgg gccgtgcggc tccgctctgg agccaaggct ctaggcaagg ccaggcgga 780  
ggtgaccgtc ctggtcctcg tcgtgctggc cgtgtgcctc ctctgtgga cgcccttcca 840  
cctggcctct gtcgtggccc tgaccacgga cctgccccag accccactgg tcatcagtat 900  
gtcctacgtc atcaccagcc tcagctacgc caactcgtgc ctgaaccct tcctctacgc 960  
ctttctagat gacaacttcc ggaagaactt ccgcagcata ttgcggtgct gaagggcact 1020  
agt 1023

<210>4

<211>333

<212>PRT

<213>Human

<400>4

Met Gln Ala Ala Gly His Pro Glu Pro Leu Asp Ser Arg Gly Ser Phe

1 5 10 15

Ser Leu Pro Thr Met Gly Ala Asn Val Ser Gln Asp Asn Gly Thr Gly

20 25 30

His Asn Ala Thr Phe Ser Glu Pro Leu Pro Phe Leu Tyr Val Leu Leu

35 40 45

Pro Ala Val Tyr Ser Gly Ile Cys Ala Val Gly Leu Thr Gly Asn Thr

50 55 60

特2002-093096

Ala Val Ile Leu Val Ile Leu Arg Ala Pro Lys Met Lys Thr Val Thr  
65                      70                      75                      80  
Asn Val Phe Ile Leu Asn Leu Ala Val Ala Asp Gly Leu Phe Thr Leu  
                         85                      90                      95  
Val Leu Pro Val Asn Ile Ala Glu His Leu Leu Gln Tyr Trp Pro Phe  
                         100                      105                      110  
Gly Glu Leu Leu Cys Lys Leu Val Leu Ala Val Asp His Tyr Asn Ile  
                         115                      120                      125  
Phe Ser Ser Ile Tyr Phe Leu Ala Val Met Ser Val Asp Arg Tyr Leu  
                         130                      135                      140  
Val Val Leu Ala Thr Val Arg Ser Arg His Met Pro Trp Arg Thr Tyr  
145                      150                      155                      160  
Arg Gly Ala Lys Val Ala Ser Leu Cys Val Trp Leu Gly Val Thr Val  
                         165                      170                      175  
Leu Val Leu Pro Phe Phe Ser Phe Ala Gly Val Tyr Ser Asn Glu Leu  
                         180                      185                      190  
Gln Val Pro Ser Cys Gly Leu Ser Phe Pro Trp Pro Glu Gln Val Trp  
                         195                      200                      205  
Phe Lys Ala Ser Arg Val Tyr Thr Leu Val Leu Gly Phe Val Leu Pro  
                         210                      215                      220  
Val Cys Thr Ile Cys Val Leu Tyr Thr Asp Leu Leu Arg Arg Leu Arg  
225                      230                      235                      240  
Ala Val Arg Leu Arg Ser Gly Ala Lys Ala Leu Gly Lys Ala Arg Arg  
                         245                      250                      255  
Lys Val Thr Val Leu Val Leu Val Val Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys  
                         260                      265                      270  
Trp Thr Pro Phe His Leu Ala Ser Val Val Ala Leu Thr Thr Asp Leu  
                         275                      280                      285  
Pro Gln Thr Pro Leu Val Ile Ser Met Ser Tyr Val Ile Thr Ser Leu

290	295	300	
Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Phe Leu Asp			
305	310	315	320
Asp Asn Phe Arg Lys Asn Phe Arg Ser Ile Leu Arg Cys			
325	330	333	

<210>5

<211>687

<212>RNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Riboprobe

<400>5

```

caaaagcugg agcuccaccg cgguggcggc cgcucuagcc cacuagugcc cuucagcacc 60
gcaauaugcu gcggaaguuc uuccggaagu ugucaucuag aaaggcguag aggaaggggu 120
ucaggcacga guuggcguag cugaggcugg ugaugacgua ggacauacug augaccagug 180
gggucugggg cagguccgug gucagggccca cgacagaggc cagguggaag ggcguccagc 240
agaggaggca cacggccagc acgacgagga ccaggacggu caccuuccgc cuggccuugc 300
cuagagccuu ggcuccagag cggagccgca cggcccgcag ccugcgcagg aggucugugu 360
agagcacaca gauggugcac acgggcagca cgaagcccag gaccaacgug uagacacggc 420
uggccuugaa ccagaccugc ucgggccacg ggaagcucag cccacagcuu gggaccugca 480
gcucguugcu guagacgccca gcgaaagaga agaagggcag aaccaggacc gugacgccc 540
gccagacaca caggcuggcg accuucgccc cccgguaggu gcgccagggc auguggcggg 600
accucacggu ggccagcacc accagguauc gguccacgcu caucacggcu aggaaguaga 660
ugcuggagaa gauguuguag uggucga 687

```

<210>6

<211>17

<212>PRT

<223>Porcine

<400>6



特2002-093096

Trp Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala

17

<210>7

<211>438

<212>DNA

<213>Human

<400>7

gccccatgag caggccagcg gcgcggccca ccgtgtggtg gcggggactc gccacgtgct 60  
tgtaccacgc gccggagggc agcggcagca ggagcagaag cagcagcagt gccagccgcg 120  
gccggctcgc gggagccccc cgctcccctg ggcgccacgc cagggcgctc gcgtcgacgg 180  
ccgcccggcg gggcgggcca cgaaccggct cggtctgggt tgggcgcgca gtggagttgg 240  
gacgcccgagg taccggagcg caggaggctg gaggcgagcc gtgggtcccc tgcaggccca 300  
gctataaccg ctcggtggcc ccgcctcgtt ccgccccctc agtaccgctg ggctccccag 360  
atggggggag ggacggaggg aggagaggga accctggcag ctggcggNgg acgtgggtac 420  
ttgagcacct cactgagt 438

<210>8

<211>264

<212>DNA

<213>Human

<400>8

gatagggtga gcgacgcagc cccatgagca ggccagcggc gcggcccacc gtgtggtagc 60  
ggggactcgc cacgtgcttg taccacgcgc cggagggcag cggcagcagg agcagaagca 120  
gcagcagtgc cagccgcggc cggctcgcgg gagccccccg ctcccctggg cgccacgcca 180  
gggcgctcgc gtcgacggcc gcccggcggg gcgggccacg aaccggctcg gctgggtttg 240  
ggcgcgcagt ggagttggga cgcc 264

<210>9

<211>424

<212>DNA

<213>Human

<400>9

gatagggtga gcgacgcagc cccatgagca ggccagcggc gcggcccacc gtgtggtagc 60  
 ggggactcgc cacgtgcttg taccacgcgc cggagggcag cggcagcagg agcagaagca 120  
 gcagcagtgc cagccgcggc cggctcgcgg gagcccccg ctcccctggg cgccacgcca 180  
 gggcgctcgc gtcgacggcc gcccgcgagg gcggggccacg aaccggctcg gctgggtttg 240  
 ggcgcgagcgt ggagttggga cggccaggta ccggagcgca ggaggttgga ggcgagccgt 300  
 gggccccctg caggcccagc tataaccgct cggctggccc gcctcgttcc gccccctcag 360  
 taccgctggg ctcccagat ggggggaggg acggaggag gagagggaac cctggcagct 420  
 ggCg 424

<210>10

<211>375

<212>DNA

<213>Human

<400>10

gcgcctcacc gtgtggtagc ggggactcgc cacgtgcttg taccacgcgc cggaggcagc 60  
 ggacagagga gcagaagcag cagcagtgcc agccgcggcc ggctcgcggg agccccccgc 120  
 tcccctgggc gccacgcagg gctacagcgt cgacggccgc ccgcggggcc atcgcaaccg 180  
 gctcggctgg gtttgggcgc gcagtggagt tgggacgcc aggtaccgga gcgcaggagg 240  
 ctggaggcga gccgtgggtc ccctgcaggc ccagctataa ccgctcgggtg gccccgcctc 300  
 gttccgcccc ctacgtaccg ctgggctccc cagaatgggg gagggacgga gggaggagag 360  
 ggaaccctgg cagct 375

<210>11

<211>260

<212>DNA

<213>Human

<400>11

cnacgttctc ggggacataa accctgttct tgtcctaacc cgccaagggg ccatggactt 60

特2002-093096

nagcgcgctg gcgtcgagca gagaagtacg gggccctggg ccggggctcc ggtgaaccgg 120  
cccctgctac cgctactgct gcttcnctc ttgtacctc tgcccgccag cgcctggtag 180  
aagcacgting cgagccctcg ctatcacaca gtingtcgtg cctccgggct gctcatnggg 240  
ctgcgccgnt cgtcctacct 260

<210>12

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>12

aactccactg cgcgcccaaa ccca 24

<210>13

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>13

tctccacag ctctgaacc cacg 24

<210>14

<211>375

<212>DNA

<213>Human

<400>14

aactccactg cgcgcccaaa ccagccgag ccggttcgtg gcccgccccg ccgggcggcc 60

gtcgacgcga gcgccctggc gtggcgccca ggggagcggg gggctccgc gagccggccg 120

cggtggcac tgctgctgct tctgctcctg ctgccgtgc cctccggcgc gtgtacaag 180

cacgtggcga gtccccgcta ccacacgggt ggccgcgccg ctggcctgct catggggctg 240

特2002-093096

cgctgctcac cctatctgtg gcgccgcgcg ctgcgcgcgg ccgccgggcc cctggccagg 300  
gacacctct ccccggaacc cgcagccgcg gaggtcctc tctgctgcc ctcgtgggtt 360  
caggagctgt gggag 375

<210>15

<211>125

<212>PRT

<213>Human

<400>15

Asn Ser Thr Ala Arg Pro Asn Pro Ala Glu Pro Val Arg Gly Pro Pro

1 5 10 15

ArgArg Ala Ala Val Asp Ala Ser Ala Leu Ala Trp Arg Pro Gly Glu

20 25 30

Arg Gly Ala Pro Ala Ser Arg Pro Arg Leu Ala Leu Leu Leu Leu

35 40 45

Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ser Gly Ala Trp Tyr Lys His Val Ala Ser

50 55 60

Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

65 70 75 80

Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Arg Arg Ala Leu Arg Ala Ala Ala Gly

85 90 95

Pro Leu Ala Arg Asp Thr Leu Ser Pro Glu Pro Ala Ala Arg Glu Ala

100 105 110

Pro Leu Leu Leu Pro Ser Trp Val Gln Glu Leu Trp Glu

115 120 125

<210>16

<211>23

<212>PRT

<213>Human

<400>16

特2002-093096

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

20 23

<210>17

<211>30

<212>PRT

<213>Human

<400>17

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp

20 25 30

<210>18

<211>69

<212>DNA

<213>Human

<400>18

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctac cacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60

atggggctg 69

<210>19

<211>90

<212>DNA

<213>Human

<400>19

tggtacaagc acgtggcgag tccccgtaccacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60

atggggctgc gtcgctcacc ctatctgtgg 90

特2002-093096

<210>20

<211>29

<212>PRT

<213>Human

<400>20

TrpTyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro TyrLeu

20 25 29

<210> 21

<211> 28

<212> PRT

<213>Human

<400>21

TrpTyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

AlaGly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr

20 25 28

<210>22

<211>27

<212>PRT

<213>Human

<400>22

特2002-093096

TrpTyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

AlaGly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro

20 25 27

<210>23

<211>26

<212>PRT

<213>Human

<400>23

TrpTyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

AlaGly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser

20 25 26

<210>24

<211>25

<212>PRT

<213>Human

<400>24

TrpTyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala GlyLeu Leu Met Gly Leu Arg Arg

20 25

<210>25

<211>24

特2002-093096

<212>PRT

<213>Human

<400>25

TrpTyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

AlaGly Leu Leu Met Gly Leu Arg

20 24

<210>26

<211>87

<212>DNA

<213>Human

<400>26

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60

atggggctgc gtcgctcacc ctatctg 87

<210>27

<211>84

<212>DNA

<213>Human

<400>27

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60

atggggctgc gtcgctcacc ctat 84

<210>28

<211>81



特2002-093096

<212>DNA

<213>Human

<400>28

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60  
atggggctgc gtcgctcacc c 81

<210>29

<211>78

<212>DNA

<213>Human

<400>29

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60  
atggggctgc gtcgctca 78

<210>30

<211>75

<212>DNA

<213>Human

<400>30

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60  
atggggctgc gtcgc 75

<210>31

<211>72

<212>DNA

<213>Human

<400>31

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60  
atggggctgc gt 72

<210>32

<211>999

<212>DNA

<213>Human

<400>32

atgcaggccgctgggcaccc agagccctt gacagcaggg gctccttctc cctccccacg 60  
atgggtgccaacgtctctca ggacaatggc actggccaca atgccacctt ctccgagcca 120  
ctgccgttctctatgtgct cctgcccgcg gtgtactccg ggatctgtgc tgtggggctg 180  
actggcaacacggcgcgtcat ccttgaatc ctaaggcgcc ccaagatgaa gacggtgacc 240  
aacgtgttcatcctgaacct ggccgtcgcc gacgggctct tcacgctggt actgccgctc 300  
aacatcgcgagcacctgct gcagtactgg cccttcgggg agctgctctg caagctgggt 360  
ctggccgtcgaccactaaa catcttctcc agcatctact tcctagccgt gatgagcgtg 420  
gaccgatacctgggtgtgct ggccaccgtg aggtcccgcg acatgccctg gcgcacctac 480  
cggggggcgaaggctgccag cctgtgtgtc tggctgggcg tcacggctct gttctgccc 540  
ttcttctctttcgtggcgt ctacagcaac gagctgcagg tccaagctg tgggctgagc 600  
ttcccggtggcccgagcgggt ctggttcaag gccagccgtg tctacacttt ggtcctgggc 660  
ttcgtgctgcccgtgtgcac catctgtgtg ctctacacag acctcctgcg caggctgcgg 720  
gccgtgcggtccgctctgg agccaaggct ctaggcaagg ccaggcgga ggtgaccgtc 780  
ctggctctcgtcgtgtgctgc cgtgtgcctc ctctgctgga cgcccttcca cctggcctct 840  
gtcgtggccctgaccacgga cctgccccag acccactgg tcatcagtat gtcttacgtc 900  
atcaccagcctcacgtacgc caactcgtgc ctgaaccctt tcctctacgc ctttctagat 960  
gacaacttccggaagaactt ccgcagcata ttgcggtgc 999

<210>33

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>33

tctccacag ctctgaacc cacg 24

<210>34

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>34

acagataggg tgagcgacgc agcc 24

<210>35

<211>1102

<212>DNA

<213>Human

<400>35

gccatttaag tggagtcttg aaggatgagtaggtgtagg cacagacgca cagaggcagg 60

caaagccaca ggctgttggg ttaggcaaaaattgagactg gctggataaa gtggtcttgg 120  
 gggaccatca ccagagagga ggcgctggaggtctgcaagg ccttgcctg ccctccagg 180  
 ggtagaggtt ccaggagggg ctgactttttctcctggaag cctcacagaa ctgcagaccc 240  
 cacggatggc ttggtgttgc caacatgaggcttctaaggc ttctcgggg agatgggttg 300  
 gtggggagaa gctgggggtg gcagtggacaggacagggtg tggggacagc tttgggagct 360  
 atgctaggca aggacaaggg acaactcttggggggactca cccagagggg tcttgaatgg 420  
 tgctgaaggc ccccgacagc cctcctgcaatagccactgt agctctgcct gcacctgggc 480  
 cttegtctg ctgtcgtccc accggcaggagtctggctaa aggggcatcc ctcagcccta 540  
 ctccctcatc agtggttcca gtaccactccctggcactt ccactcctag agggaggagg 600  
 ctgagcaggc agagaatggg acgtgtcccctcagaggagc ctcgagccca gttccagcca 660  
 gcggcccaact cagtgggtg ctcaagtaccacgtccccc gccagctgcc agggttccct 720  
 ctccctcctc cgtccctccc cccatctggggagcccagcg gtactgaggg ggcggaacga 780  
 ggcgggggcca ccgagcggtt atagctgggcctgcagggga cccacggctc gcctccagcc 840  
 tcctgcgctc cggtacctgg gcgtcccaactccactgcgc gcccaaacc agccgagccg 900  
 gttcgtggcc cgccccgccg ggcgcccgctcgacgcgagcg ccctggcgtg gcgcccaggg 960  
 gagcgggggg ctcccgcgag ccggcccggtgctggcactgc tgctgcttct gctcctgctg 1020  
 ccgctgccct ccggcgctg gtacaagcacgtggcgagtc cccgctacca cacggtgggc 1080  
 cgcgccgctg gcctgctcat gg 1102

<210>36

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>36

aactccactg cgcgccc aaa ccca 24

<210>37

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>37

ctggcactgc tgctgcttct gctc 24

<210>38

<211>609

<212>DNA

<213> Human

<400>38

ctgctgccgctgccctccgg cgcggtgtac aagcacgtgg cgagtccccg ctaccacacg 60  
gtgggccgcgccgtggcct gtcctggtgg ctgcgtcgtt caccctatct gtggcgccgc 120  
gcgctgcgcgcggccgcgg gccctggcc agggacaccc tctccccga acccgagcc 180  
cgcgaggctc ctctcctgctgccctcgtgg gttcaggagc tgtgggagac gcgacgcagg 240  
agctcccaggcagggatccc cgtccgtgcg ccccgagcc cgcgcgcccc agagcctgcg 300  
ctggaaccggagtccttga cttcagcgga gctggccaga gacttcggag agacgtctcc 360  
cgcccagcggtggacccgc agcaaaccgc cttggcctgc cctgcctggc ccccgaccg 420  
ttctgacagcgtccccgcc cgcccggtgc gcctccgcgc ctgaccagc aggagtggcc 480  
gcgcgcttcaggagccgct catagacccc gcctgccgtc cggtaataa aatccgcctg 540  
actcctgcgccccgcgtgc gtaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa agcgccgct 600  
gaattctag 609

特2002-093096

<210>39

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>39

agcggctactg agggggcgga acga 24

<210>40

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>40

gggtctatga gcggctcctg gaag 24

<210>41

<211>719

<212>DNA

<213> Human

<400>41

特2002-093096

ggcggggcca ccgagcggtt atagctgggcctgcagggga cccacggctc gcctccagcc 60  
tcctgcgctc cggtacctgg gcgtcccaactccactgcgc gcccaaacc agccgagccg 120  
gttcgtggcc cgccccgcg ggcgcccgctcgacgcgagcg ccctggcggtg gcgcccaggg 180  
gagcgggggg ctcccgcgag ccggcccggtggcactgc tgctgcttct gctcctgctg 240  
ccgctgccct ccggcgcggtg gtacaagcacgtggcgagtc cccgtacca cacggtgggc 300  
cgcgccgctg gcctgctcat ggggctgcgtcgctcaccct atctgtggcg ccgcgcgctg 360  
cgcgccggccg ccggggccct gccaggacaccctctccc ccgaaccgc agcccgcgag 420  
gctcctctcc tgctgccctc gtgggttcaggagctgtggg agacgcgacg caggagctcc 480  
caggcagga tccccgtccg tgcgccccggagcccgcgcg cccagagcc tgcgctgga 540  
ccggagtccc tggacttcag cggagctggccagagacttc ggagagacgt ctcccgccca 600  
gcggtggacc ccgcagcaaa ccgccttggcctgccctgcc tggcccccg accgttctga 660  
cagcgtcccc cgcccggccg tggcgctccgcgcctgacc caggaggagt ggccgcgcg 719

<210>42

<211>165

<212>PRT

<213>Human

<400>42

Leu Ala TrpArg Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Ala Ser Arg Pro Arg  
1 5 10 15  
Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu LeuLeu Pro Leu Pro Ser Gly Ala  
20 25 30  
Trp Tyr LysHis Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala  
35 40 45  
Ala Gly LeuLeu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Arg Arg  
50 55 60  
Ala Leu Arg Ala Ala Ala Gly Pro LeuAla Arg Asp Thr Leu Ser Pro  
65 70 75 80

特2002-093096

Glu Pro AlaAla Arg Glu Ala Pro Leu Leu Leu Pro Ser Trp Val Gln

85

90

95

Glu Leu TrpGlu Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Ala Gly Ile Pro Val

100

105

110

Arg Ala ProArg Ser Pro Arg Ala Pro Glu Pro Ala Leu Glu Pro Glu

115

120

125

Ser Leu Asp Phe Ser Gly Ala Gly GlnArg Leu Arg Arg Asp Val Ser

130

135

140

Arg Pro AlaVal Asp Pro Ala Ala Asn Arg Leu Gly Leu Pro Cys Leu

145

150

155

160

Ala Pro Gly Pro Phe

165

<210>43

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>43

acagataggg tgagcgacgc agcc 24

<210>44

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence



特 2 0 0 2 - 0 9 3 0 9 6

<220>

<223>Primer

<400>44

tgagcgacgc agcccatga gcag 24

<210>45

<211>235

<212>DNA

<213> Porcine

<400>45

cgacacccctgcgccagac cctccggagc cagttcctgg tccgccccgc cgggagccgt 60  
cagcatgaacccccgggcac gcggcatggg agcgcggggc ccgggaccgg gggccactgc 120  
gaggcgccggctgctggcat tgctgttact gctgctgctg ctgccgtgc ccgccgtgc 180  
ctggtacaagcacacggcga gtccccgcta ccacacggtg ggccgcgccg cgggc 235

<210>46

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>46

cagcggcagc agcagcagca gtaa 24

<210>47

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>47

cagcagtaac agcaatgcca gcag 24

<210>48

<211>156

<212>DNA

<213> Porcine

<400>48

ctgtagcctc ccgcgctgcg gcttcccgacacccctgcgc ccagaccctc cggagccagt 60  
tcctgggtccg ccccgccggg agccgtcagcatgaaccccc gggcacgcgg catgggagcg 120  
cggggcccgg gaccgggggc cactgcgaggcgccgg 156

<210>49

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>49

cggctgctgg cattgctgtt actg 24

<210>50

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>50

cgcccgtagcc tggtagaagc aca 23

<210>51

<211>588

<212>DNA

<213> Porcine

<400>51

cggcgagtagc ccgctaccac acggtgggcccgcgcgcggg cctgctcatg gggctgcgcc 60  
gctcgcccta catgtggcgc cgcgcgctgcgccggcgcc cgggcccctg gcctgggaca 120  
ctttcgcca ggacgtgcc cctcggggaccctccgccag gaacgccctc tctccggggc 180  
ccgcccctcg cgacgtccg ctgttcccccggggttca gacactgtgg caggtgcgac 240  
gcggaagctt ccgctccggg atcccggtcagtcgccccg cagcccgcgc gcccggggt 300  
ccgagccgca accggaattg ggcgcctcttcttgacctc ggaggagtag accagagcct 360  
tcggagagtc ttcagctcag cggtagtctgcgcagggaac cgccttcgcc agccccgcc 420  
tcgccccagc gtcagagccg acctgatcgc ggccccggcggcgcggcccc gcgcctggcc 480  
cccgcggagt ctcttcgcgc cccagggccggcgtctgtt caataaaacc cgcctagttc 540

ctgcgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaa

588

<210>52

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>52

ttcccgcac ccctgcgcc agac 24

<210>53

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>53

gggctggcga aggcggttcc ctgc 24

<210>54

<211>565

<212>DNA

<213> Porcine

<400>54

cctccggagc cagttcctgg tccgccccgccgggagccgt cagcatgaac ccccgggcac 60  
 gcggcatggg agcgcggggc ccgggaccgggggccactgc gaggcgccgg ctgctggcat 120  
 tgctgttact gctgctgctg ctgccgtgcccggcccgctg ctggtacaag cacacggcga 180  
 gtccccgcta ccacacgggtg ggccgcgcgcggggcctgct catggggctg cgccgctcgc 240  
 cctacatgtg gcgccgcgcg ctgcgcccggcgccggggcc cctggcctgg gacactttcg 300  
 gccaggacgt gccccctcgg ggaccctccgccaggaacgc cctctctccg gggccccccc 360  
 ctgcgcagcg tccgctgctt cccccgggggttcagacact gtggcagggtg cgacgcggaa 420  
 gcttccgctc cgggatcccg gtcagtgcgccccgcagccc gcgcgcccgg ggggccgagc 480  
 cgcaaccgga attgggcgcc tcttcttgacctcggcgga gtagaccaga gccttcggag 540  
 agtcttcagc tcagcgggtg tctgc 565

<210>55

<211>159

<212>PRT

<213>Porcine

<400>55

Met Asn Pro Arg Ala Arg Gly Met GlyAla Arg Gly Pro Gly Pro Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Thr AlaArg Arg Arg Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu  
 20 25 30  
 Leu Pro Leu Pro Ala Arg Ala Trp-TyrLys His Thr Ala Ser Pro Arg  
 35 40 45  
 Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala GlyLeu Leu Met Gly Leu Arg Arg  
 50 55 60  
 Ser Pro Tyr Met Trp Arg Arg Ala LeuArg Pro Ala Ala Gly Pro Leu  
 65 70 75 80  
 Ala Trp Asp Thr Phe Gly Gln Asp ValPro Pro Arg Gly Pro Ser Ala

特2002-093096

85 90 95  
Arg Asn Ala Leu Ser Pro Gly Pro AlaPro Arg Asp Ala Pro Leu Leu  
100 105 110  
Pro Pro Gly Val Gln Thr Leu Trp GlnVal Arg Arg Gly Ser Phe Arg  
115 120 125  
Ser Gly Ile Pro Val Ser Ala Pro ArgSer Pro Arg Ala Arg Gly Ser  
130 135 140  
Glu Pro Gln Pro Glu Leu Gly Ala SerSer Trp Thr Ser Ala Glu  
145 150 155 159

<210>56

<211>23

<212>PRT

<213>Porcine

<400>56

Trp Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala  
1 5 10 15  
AlaGly Leu Leu Met Gly Leu  
20 23

<210>57

<211>30

<212>PRT

<213>Porcine

<400>57

TrpTyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala  
1 5 10 15

特2002-093096

AlaGly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Met Trp

20

25

30

<210>58

<211>69

<212>DNA

<213>Porcine

<400>58

tggtacaagc acacggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc gggcctgctc 60

atggggctg

69

<210>59

<211>90

<212>DNA

<213>Porcine

<400>59

tggtacaagc acacggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc gggcctgctc 60

atggggctgc gccgctcgccctacatgtgg

90

<210>60

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

特2002-093096

<400>60

cgttctcggg gacataaac cctg 24

<210>61

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>61

atgagcagc ccggaggcac gacc 24

<210>62

<211>188

<212>DNA

<213>Rat

<400>62

ttcttgtcct aaccgcca ggggccatggacttgagcgc gctggcgtcg agcagagaag 60

tacggggccc tgggccggg gctccggtgaaccggcccct gctaccgcta ctgctgcttc 120

tgctcttgct acctctgccc gccagcgcctggtacaagca cgtggcgagc cctcgctatc 180

acacagtg 188

<210>63

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence



<220>

<223>Primer

<400>63

atgagcagcc cggaggcacg acc 23

<210>64

<211>23

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>64

actgtgtgat agcgagggt cgc 23

<210>65

<211>615

<212>DNA

<213>Rat

<400>65

ctcagagctg tactaggcag gaagagggacggccctcagg gaagggtggc cctatgctta 60  
aaactttcct gtctcctctc cataagtgtccactttag caactcctac caagggggca 120  
tccttttgcc cctggcagcc catccttgtattctgagacc atgcatggta ccagaactcc 180  
ctccctgaca gttcccttcc tgggggcgaggaaagggtaa gcaaggagat cccccactaa 240  
agcttcaagc gcagtccagc ttgcgatctactcattggga ggcttctagc taccggggtt 300  
ccctcttctc cctccctctc catcctcctctcccttgggc atgtgccgcg ggggcgagcc 360  
ggggcggggc cattgagaag ctgtagtgcaccaactgac tagtctcttc catcctccgg 420

特 2002-093096

agctccgacg ttctcgggga cataaacctgttcttgcc taaccgcca aggggccatg 480  
gacttgagcg cgctggcgtc gagcagagaagtacggggcc ctgggcccg ggctccggtg 540  
aaccggcccc tgctaccgct actgctgcttctgctcttgcc tacctctgcc cgccagcgcc 600  
tggtacaagc acgtg 615

<210>66

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>66

cgttctcgg ggacataaac cctg 24

<210>67

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>67

cgagccctcg ctatcacaca gtgg 24

<210>68

<211>497

<212>DNA

<213>Rat

<400>68

gtcgtgcctc cgggctgctc atggggctgcgccgctcgcc ctacctgtgg cgccgtgcct 60  
tgggtggggc cgctggaccg ctctggggctcccgggaca gatggcccgc agcgctctcc 120  
tgcttccttc ccccgggcag gagctgtgggaggtacgaag caggagtcca ccggcaggac 180  
ttcccgctga tgcaaccggg agtctgcgggacctggaggg agccggccaa cctgagcagt 240  
cgctaagctt tcagtcctgg acttcagcagagcccgtgc tagagccttc ggtgagacgc 300  
ttcgtgcca gccatggttc ctgcagcaaatcatctttgc cgatcctgtc aggctcgacg 360  
accgtctcaa gaaccgatgg cgccccgtgcttgacctaa gcaggagcac agcttgtagc 420  
tccagtcagg tctcgttgtc tggtaataaaatcactctg attcccaaaa aaaaaaaaaa 480  
aaaaaaaaa aaaaaaa 497

<210>69

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>69

ggggcggggc cattgagaag c 21

<210>70

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>70

tgaccagaca acgagacctg a 21

<210>71

<211>684

<212>DNA

<213>Rat

<400>71

tgtagtgcga ccaactgact agtctcttccatcctccgga gctccgacgt tctcggggac 60  
ataaacctg ttcttgctct aaccgcgaaggggcatgg acttgagcgc gctggcgctg 120  
agcagagaag tacggggccc tggggccggggctccggtga accggccct gctaccgcta 180  
ctgctgcttc tgctcttgct acctctgcccgcagcgct ggtacaagca cgtggcgagc 240  
cctcgctatc acacagtggg tcgtgcctccgggctgctca tggggctgcg ccgctcgccc 300  
tacctgtggc gccgtgcctt ggggtggggccgctggaccgc tcgtggggct cccgggacag 360  
atggcccga gcgctctcct gcttccttccccgggcagg agctgtggga ggtacgaagc 420  
aggagttcac cggcaggact tcccgtgcatgcaaccgga gtctgcggga cctggaggga 480  
gccggccaac ctgagcagtc gctaagctttcagtcctgga cttcagcaga gcccgctgct 540  
agagccttcg gtgagacgt tcgtgccagccatggttc tgcagcaat catctttgcc 600  
gatcctgtca ggctcgacga ccgtctcaagaaccgatggc gccccgtgc ttgacctaa 660  
caggagcaca gctttagct ccag 684

<210>72

<211>185

<212>PRT

特2002-093096

<213>Rat

<400>72

Met Asp Leu Ser Ala Leu Ala Ser SerArg Glu Val Arg Gly Pro Gly

1 5 10 15

Pro Gly Ala Pro Val Asn Arg Pro LeuLeu Pro Leu Leu Leu Leu

20 25 30

Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ala Ser AlaTrp Tyr Lys His Val Ala Ser

35 40 45

Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg AlaSer Gly Leu Leu Met Gly Leu

50 55 60

Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Arg ArgAla Leu Gly Gly Ala Ala Gly

65 70 75 80

Pro Leu Val Gly Leu Pro Gly Gln MetAla Arg Ser Ala Leu Leu Leu

85 90 95

Pro Ser ProGly Gln Glu Leu Trp Glu Val Arg Ser Arg Ser Ser Pro

100 105 110

Ala Gly LeuPro Val His Ala Thr Arg Ser Leu Arg Asp Leu Glu Gly

115 120 125

Ala Gln GlnPro Glu Gln Ser Leu Ser Phe Gln Ser Trp Thr Ser Ala

130 135 140

Glu Pro AlaAla Arg Ala Phe Gly Glu Thr Leu Arg Ala Gln Pro Trp

145 150 155 160

Phe Leu GlnGln Ile Ile Phe Ala Asp Pro Val Arg Leu Asp Asp Arg

165 170 175

Leu Lys Asn Arg Trp Arg Pro Arg Ala

180 185

<210>73

特2002-093096

<211>23

<212>PRT

<213>Rat

<400>73

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu

20 23

<210> 74

<211> 30

<212> PRT

<213> Rat

<400>74

TrpTyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg SerPro Tyr Leu Trp

20 25 30

<210> 75

<211> 69

<212> DNA

<213> Rat

<400> 75

tggtacaagcacgtggcgag ccctcgctat cacacagtgg gtcgtgcctc cgggctgctc 60

atggggctg 69

<210> 76

<211> 90

<212> DNA

<213> Rat

<400> 76

tggtacaagcacgtggcgag ccctcgctat cacacagtgg gtcgtgcctc cgggctgctc 60  
atggggctgcgccgctcgcc ctacctgtgg 90

<210> 77

<211> 23

<212> DNA

<213> ArtificialSequence

<220>

<223> Probe

<400> 77

ttcatcctcaacctggccat cgc 23

<210>78

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>78

acccagttct tgcctaacc ctcc 24

特2002-093096

<210>79

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>79

cctgcttcgt acctcccaca gctc 24

<210>80

<211>311

<212>DNA

<213>Mouse

<400>80

aaggggcaat tgacgtgagc gcgctggcgtctaacagaga agtacggggc cctgggcccg 60  
ggactcccag gaaccggccc ctgctgcccctgctgctgct tctgctcttg ctaccgctgc 120  
ccgccagcgc ctggtataag cacgtggcgagtcctcccgcta tcacacagtg ggtcgtgcct 180  
ccgggctgct catggggctg cgccgctcgcctaccagtg gcgccgtgcc ctgggcgggg 240  
ctgctggacc cctctcccgg ctcccaggaccggtcggccg cggcgctctc ctgcttcctt 300  
cctcagggca g 311

<210>81

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence



<220>

<223>Primer

<400>81

catgagcagc ccggaggcac gacc 24

<210>82

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>82

gtgatagcgg ggactcgcca cgtg 24

<210>83

<211>237

<212>DNA

<213>Mouse

<400>83

aaaggctgta gtcgcaccaa ctgactggctcctcctt ggagctccga cgtgctcgtt 60  
ctcggagaca taaaccagcgt tcttgctcctaaccctccaag gggcaattga cgtgagcgcg 120  
ctggcgtcta acagagaagt acggggccctgggcccggga ctcccaggaa ccggcccctg 180  
ctggcccctgc tgctgcttct gctcttgctaccgctgcccg ccagcgccctg gtataag 237

<210>84

特 2 0 0 2 - 0 9 3 0 9 6

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>84

accagttct tgcctaacc ctcc 24

<210>85

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>85

gggcaattga cgtgagcgcg ctgg 24

<210>86

<211>598

<212>DNA

<213>Mouse

<400>86

cgtctaacag agaagtacgg ggccctgggcccgggactcc caggaaccgg cccctgctgc 60

ccctgctgct gttctgctc ttgctaccgtgcccgcag cgcctggtat aagcacgtgg 120

特2002-093096

cgagtcctccg ctatcacaca gtgggtcgtgcctccgggt gtcctatggg ctgcgccgt 180  
cgccctacca gtggcgccgt gccctgggCggggctgctgg acccctctcc cggctcccag 240  
gaccggtcgc ccgcggcgct ctctgtcttcttctcagg gcaggagctg tgggaggtac 300  
gaagcaggag ctacactgca gggcttcccgtccatgcacc ctggagtccg cgggacctgg 360  
agggagtccg ccaaccggag cagtcgctaagccttcactc ctggatctca gaggagcccg 420  
ctgctagagc cttcgagag acgcttcgtgccagccatg gttcctgcag caagtcatt 480  
ttgccgatcc tgtcaggccc aagaaccgatggcgccccca tgcttgacct aggcaggagc 540  
acagcttgaa gctccagtca ggcctcgtgtttctggtcaa taaaaccaac ctgattcc 598

<210>87

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>87

aaaggctgtagtcgcaccaa c 21

<210>88

<211>21

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>88

特 2 0 0 2 - 0 9 3 0 9 6

accagaaaca cgaggcctga c 21

<210>89

<211>659

<212>DNA

<213>Mouse

<400>89

tgactggtct ccattcctctg gagctccgacgtgctcggtc tcggagacat aaaccagtt 60  
cttgtcctaa ccttccaagg ggcaattgacgtgagcgcg tggcgtctaa cagagaagta 120  
cgggggcctg ggccccggac tcccaggaaccggccccctgc tgcccctgct gctgcttctg 180  
ctcttgctac cgctgcccgc cagcgccctggtataagcac tggcgagtcc ccgtatcac 240  
acagtgggtc gtgcctccgg gctgctcatggggctgcgcc gctcgcccta ccagtggcg 300  
cgtgccctgg gcggggctgc tggacccctctcccggctcc caggaccgt cgcccgcg 360  
gctctcctgc ttcttctc agggcaggagctgtgggagg tacgaagcag gagctcacct 420  
gcagggttc ccgtccatgc accctggagtcccgggacc tggagggtc ccgccaaccg 480  
gagcagtcgc taagccttca ctctggatctcagaggagc ccgtgctag agccttcgga 540  
gagacgttc gtgcccagcc atggttcctgcagcaagtca tctttgccga tcctgtcagg 600  
cccaagaacc gatggcgccc ccattgcttgacctaggcagg agcacagctt gaagctcca 659

<210>90

<211>176

<212>PRT

<213>Mouse

<400>90

Leu Ala Ser Asn Arg Glu Val Arg GlyPro Gly Pro Gly Thr Pro Arg

1

5

10

15

Asn Arg ProLeu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu

特2002-093096

20 25 30  
Pro Ala Ser Ala Trp Tyr Lys His ValAla Ser Pro Arg Tyr His Thr  
35 40 45  
Val Gly Arg Ala Ser Gly Leu Leu MetGly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr  
50 55 60  
Gln Trp Arg Arg Ala Leu Gly Gly AlaAla Gly Pro Leu Ser Arg Leu  
65 70 75 80  
Pro Gly Pro Val Ala Arg Gly Ala LeuLeu Leu Pro Ser Ser Gly Gln  
85 90 95  
Glu Leu Trp Glu Val Arg Ser Arg SerSer Pro Ala Gly Leu Pro Val  
100 105 110  
His Ala Pro Trp Ser Pro Arg Asp LeuGlu Gly Val Arg Gln Pro Glu  
115 120 125  
Gln Ser Leu Ser Leu His Ser Trp IleSer Glu Glu Pro Ala Ala Arg  
130 135 140  
Ala Phe Gly Glu Thr Leu Arg Ala GlnPro Trp Phe Leu Gln Gln Val  
145 150 155 160  
Ile Phe Ala Asp Pro Val Arg Pro LysAsn Arg Trp Arg Pro His Ala  
165 170 175 176

<210>91

<211>23

<212>PRT

<213>Mouse

<400>91

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala  
1 5 10 15  
SerGly Leu Leu Met Gly Leu

特2002-093096

20

23

<210>92

<211>30

<212>PRT

<213>Mouse

<400>92

TrpTyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

SerGly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Gln Trp

20

25

30

<210>93

<211>69

<212>DNA

<213>Mouse

<400>93

tggtataagc acgtggcgag tccccgctatcacacagtgg gtcgtgcctc cgggctgctc 60

atggggctg 69

<210>94

<211>90

<212>DNA

<213>Mouse

<400>94

tggtataagc acgtggcgag tccccgctatcacacagtgg gtcgtgcctc cgggctgctc 60

atggggctgc gccgctcgcctaccagtgg

90

<210>95

<211>23

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>Xaa on the 21st position means Met(0)

<223>

<400>95

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

AlaGly Leu Leu Xaa Gly Leu

20

23

<210>96

<211>22

<212>PRT

<213>Human

<400>96

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

AlaGly Leu Leu Met Gly

20

22

<210>97

<211>21

特2002-093096

<212>PRT

<213>Human

<400>97

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

AlaGly Leu Leu Met

20 21

<210>98

<211>20

<212>PRT

<213>Human

<400>98

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

AlaGly Leu Leu

20

<210>99

<211>19

<212>PRT

<213>Human

<400>99

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

AlaGly Leu



19

<210>100

<211>18

<212>PRT

<213>Human

<400>100

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

AlaGly

18

<210>101

<211>17

<212>PRT

<213>Human

<400>101

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

Ala

17

<210>102

<211>16

<212>PRT

<213>Human

特2002-093096

<400>102

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15 16

<210>103

<211>23

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>Xaa on the 21st position means Met(0)

<223>

<400>103

Trp Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

AlaGly Leu Leu Xaa Gly Leu

20 23

<210>104

<211>23

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>Xaa on the 21st position means Met(0)

<223>

<400>104

Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

特 2 0 0 2 - 0 9 3 0 9 6

SerGly Leu Leu Xaa Gly Leu

20

23

<210>105

<211>23

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>Xaa on the 1st position means Fmoc Trp

<223>

<400>105

Xaa Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

AlaGly Leu Leu Met Gly Leu

20

23

<210>106

<211>23

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>Xaa on the 1st position means Ac Trp

<223>

<400>106

Xaa Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

AlaGly Leu Leu Met Gly Leu

特2002-093096

20

23

<210>107

<211>22

<212>PRT

<213>Human

<400>107

Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala

1

5

10

15

GlyLeu Leu Met Gly Leu

20

22

<210>108

<211>20

<212>PRT

<213>Human

<400>108

His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu

1

5

10

15

Leu Met Gly Leu

20

<210> 109

<211> 15

<212> PRT

<213>Human

特2002-093096

<400>109

Arg Tyr HisThr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

1 5 10 15

<210>110

<211>9

<212>PRT

<213>Human

<400>110

ArgAla Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu

1 5 9

<210>111

<211>22

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>Xaa on the 1st position means Ac Tyr

<223>

<400>111

Xaa Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala

1 5 10 15

GlyLeu Leu Met Gly Leu

20 22

<210>112

<211>23

特2002-093096

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>Xaa on the 1st position means DTrp

<223>

<400>112

Xaa Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala

1 5 10 15

AlaGly Leu Leu Met Gly Leu

20 23

<210>113

<211>22

<212>PRT

<213>Human

<213>Artificial Sequence

<220>Xaa on the 1st position means 3-Indolepropanoyl Tyr

<223>

<400>113

Xaa Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala

1 5 10 15

GlyLeu Leu Met Gly Leu

20 22

<210>114

<211>66

特2002-093096

<212>DNA

<213>Human

<400>114

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60  
atgggg 66

<210>115

<211>63

<212>DNA

<213>Human

<400>115

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60  
atg 63

<210>116

<211>60

<212>DNA

<213>Human

<400>116

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc tggcctgctc 60

<210>117

<211>57

<212>DNA

<213>Human

<400>117

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc tggcctg 57

<210>118

<211>54

<212>DNA

<213>Human

<400>118

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc tggc 54

<210>119

<211>51

<212>DNA

<213>Human

<400>119

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc t 51

<210>120

<211>48

<212>DNA

<213>Human

<400>120

tggtacaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgcc 48

<210>121

<211>66



特2002-093096

<212>DNA

<213>Human

<400>121

tacaagcacg tggcgagtcc ccgctaccacacggtgggcc gcgccgctgg cctgctcatg 60

gggctg

66

<210>122

<211>60

<212>DNA

<213>Human

<400>122

cacgtggcga gtccccgcta ccacacggtgggccgcgccg ctggcctgct catggggctg 60

<210>123

<211>45

<212>DNA

<213>Human

<400>123

cgctaccaca cggtgggccg cgccgctggcctgctcatgg ggctg

45

<210>124

<211>27

<212>DNA

<213>Human

<400>124

cgcgccgctg gcctgctcat ggggctg

27

<210>125

<211>51

<212>DNA

<213>Porcine

<400>125

tggtagaagc acacggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccgc g

51

<210>126

<211>329

<212>PRT

<213>Rat

<400>126

MetHis Asn Leu Ser Leu Phe Glu Pro Gly Arg Gly Asn Val Ser Cys

5

10

15

GlyGly Pro Phe Leu Gly Cys Pro Asn Glu Ser Asn Pro Ala Pro Leu

20

25

30

ProLeu Pro Gln Pro Leu Ala Val Ala Val Pro Val Val Tyr Gly Val

35

40

45

IleCys Ala Val Gly Leu Ala Gly Asn Ser Ala Val Leu Tyr Val Leu

50

55

60

LeuArg Thr Pro Arg Met Lys Thr Val Thr Asn Val Phe Ile Leu Asn

65

70

75

80

Leu Ala Ile Ala Asp Glu Leu Phe Thr Leu Val LeuPro Ile Asn Ile

85

90

95

AlaAsp Phe Leu Leu Arg Arg Trp Pro Phe Gly Glu Val Met Cys Lys

特2002-093096

100	105	110	
LeuIle Val Ala Val Asp Gln Tyr Asn Thr Phe Ser Ser Leu Tyr Phe			
115	120	125	
LeuAla Val Met Ser Ala Asp Arg Tyr Leu Val Val Leu Ala Thr Ala			
130	135	140	
GluSer Arg Arg Val Ser Gly Arg Thr Tyr Gly Ala Ala Arg Ala Val			
145	150	155	160
SerLeu Ala Val Trp Ala Leu Val Thr Leu Val Val Leu Pro Phe Ala			
165	170	175	
ValPhe Ala Arg Leu Asp Glu Glu Gln Gly Arg Arg Gln Cys Val Leu			
180	185	190	
ValPhe Pro Gln Pro Glu Ala Phe Trp Trp Arg Ala Ser Arg Leu Tyr			
195	200	205	
ThrLeu Val Leu Gly Phe Ala Ile Pro Val Ser Thr Ile Cys Ala Leu			
210	215	220	
TyrIle Thr Leu Leu Cys Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Asp Ser His			
225	230	235	240
AlaLys Ala Leu Asp Arg Ala Lys Lys Arg Val Thr Leu Leu Val Val			
245	250	255	
AlaIle Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Trp Thr Pro Tyr His Leu Ser			
260	265	270	
ThrIle Val Ala Leu Thr Thr Asp Leu Pro Gln Thr Pro Leu Val Ile			
275	280	285	
GlyIle Ser Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu			
290	295	300	
AsnPro Phe Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Asp Ser Phe Arg Arg Ser Leu			
305	310	315	320
ArgGln Leu Val Ser Cys Arg Thr Ala			

325

329

<210>127

<211>987

<212>DNA

<213>Rat

<400>127

```

atgcacaacttgtcgtctt cgagcctggc aggggcaatg tgtcttgagg cggcccattt 60
ttgggctgtcctaacgagtc gaaccacagc cctctgccac tgccgcagcc tctggcggta 120
gcagtgcctgtggtctacgg ggtgatctgc gcggtgggac tggcgggcaa ctccgcggtg 180
ctgtacgtactgtcgcac gccgcgatg aagactgtta ccaacgtgtt cattctcaac 240
ctggctatcgcggacgagct cttcacctc gtgctgcca tcaacatgc ggacttcctg 300
ctgaggcgctggcccttcgg ggaagtcatg tgcaagctca tcgtggctgt cgaccagtac 360
aacactttctctagcctcta cttcctcgc gtcagtgcg cagaccgcta cctggttgtc 420
ctggccacagccgagtcgcg ccgggtgtcc gggcgcaatt atggtgcagc gcgggctgtc 480
agtctggcgggtgtggcgct ggtgacattg gtgctgtgc cttttgcgg attcgcccg 540
ctggacgaagagcagggtcg gcgtcagtgc gtgctggtt tccgcagcc tgaggccttc 600
tggtggcgccagccgtct gtacactcta gtgttgggt tcgccatccc ggtgtccacc 660
atctgcgccctctatcac cctgttgtgc cgactgcgtg ctatccagct agacagccac 720
gccaaggccctggaccgtgc caagaagcgc gtgacctgt tggtgggtgc gattctggct 780
gtgtgcctcctctgtggac accgtaccac ctgagcacca tagtggcgt caccaccgac 840
ctcccgcaaacaccgttggc catcgcatc tcttacttca tcaccagtct gagctatgcc 900
aacagctgcctcaaccctt cctctatgcc ttcctggacg acagcttccg caggagcctg 960
cggcagctggtgtcatgcc cacagcc 987

```

<210>128

<211>28

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>128

actgatatgcacaacttgtc gctcttcg 28

<210>129

<211>28

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>129

actagttcaggctgtgcggc atgacacc 28

<210>130

<211>19

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>130

gttggtggtggcgattctg 19

<210>131

<211>19

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>131

tggtgagcgccactatggt 19

<210>132

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>132

gtccgcgatgttgatgggca gcac 24

<210>133

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>133

gaagagctcatcggcgatag ccag 24

<210>134

<211>440

<212>DNA

<213>Mouse

<400>134

taagcagtggtaacaacgca gactacgcgg gggcgcataa gcagtggtaa caacgcagag 60  
tcacgcggggagtgccctggg tgcagatccc tgtaaactg ggcgcataaa cctcgagttt 120  
cgcggggctgctgagtggaa tcctgggtgt cgcctgctct ccagccctct ccaagatgca 180  
taacttaacgcttttcgagt ctggagggga caacgtgtct tgcggcggct catctttggg 240  
ctgtcccaacgggtccagcc tggctcctct gccgctgccg cagccactgg cggtagcagt 300  
gcctgtcgtctacggggtaa ttgcccgt gggactggct ggcaactctg cggtgctgta 360  
cgtactgctgcgcacgccgc gcatgaagac tgcaccaac gtgttcattc tcaacctggc 420  
tatcgccgatgagctcttca 440

<210>135

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>135

tttcgcggggctgctgagtg gaat

24

<210>136

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Primer

<400>136

agtgcctgcctgcggtggaaa gagg

24

<210>137

<211>1083

<212>DNA

<213>Mouse

<400>137

tttcgcggggctgctgagtg gaatcctggt ggtcgccctgc tctccagccc tctccaagat 60  
gcataacttaacgcttttcg agtctggagg ggacaacgtg tcttgcggcg gctcatcttt 120  
gggctgtcccaacgggtcca gcctggctcc tctgccgctg ccgcagccac tggcggtagc 180  
agtgcctgtcgtctacgggg taatttgcg cgtgggactg gctggcaact ctgcggtgct 240  
gtacgtactgctgcgcacgc cgcgcatgaa gactgtcacc aacgtgttca tcctcaacct 300  
ggctatcgccgatgagctct tcaccctcgt gctgcccatc aacatcgcg acttcctgct 360  
gaggcgctggcccttcgggg aggtcatgtg caagctcatt gtagccgtcg accagtacaa 420  
cactttctctagcctctact tcctcgccgt catgagcgcc gaccgatacc tgggtgttct 480  
ggccacagcagagtcgcgcc ggggtgtccg gcgcacttac ggtgcagcgc gtgctgtcag 540  
tctggcgggtgtggcgctgg tgacgctggt cgtgctgccc tttgcggtat tcgctcggct 600



特2002-093096

ggacgaggagcagggtcggc gccagtgcgt gctggctctc ccgcagcccg aggccttctg 660  
gtggcgtgccagccgtctct acacactagt attgggcttt gccatcccgg tgaccacat 720  
ctgtgctctctataccactc tgctctgccg actgcgtgct atccagctag atagccacgc 780  
caaggccctggatcgtgcc aagaagcgcgt gaccttggtg gtggcggcga ttctggctgt 840  
gtgcctcctctgctggacgc cttatcacct gagtaccata gtggccctca ccaccgacct 900  
cccgaaaacgccgctgggtca tcggcatctc ttacttcac accagcctga gctatgctaa 960  
cagctgcctcaaccctttcc tctatgcctt cctggacgac agcttccgca gaagcctccg 1020  
gcaattggtgtcatgccgtt cagcctgatg cctttccac ctctttccac cgcaggcagc 1080  
act 1083

<210>138

<211>329

<212>PRT

<213>House

<400>138

MethHis Asn Leu Thr Leu Phe Glu Ser Gly Gly Asp Asn Val Ser Cys  
5 10 15  
GlyGly Ser Ser Leu Gly Cys Pro Asn Gly Ser Ser Leu Ala Pro Leu  
20 25 30  
ProLeu Pro Gln Pro Leu Ala Val Ala Val Pro Val Val Tyr Gly Val  
35 40 45  
IleCys Ala Val Gly Leu Ala Gly Asn Ser Ala Val Leu Tyr Val Leu  
50 55 60  
LeuArg Thr Pro Arg Met Lys Thr Val Thr Asn Val Phe Ile Leu Asn  
65 70 75 80  
Leu Ala Ile Ala Asp Glu Leu Phe Thr Leu Val LeuPro Ile Asn Ile  
85 90 95  
AlaAsp Phe Leu Leu Arg Arg Trp Pro Phe Gly Glu Val Met Cys Lys

特2002-093096

100	105	110	
LeuIle Val Ala Val Asp Gln Tyr Asn Thr Phe Ser Ser Leu Tyr Phe			
115	120	125	
LeuAla Val Met Ser Ala Asp Arg Tyr Leu Val Val Leu Ala Thr Ala			
130	135	140	
GluSer Arg Arg Val Ser Gly Arg Thr Tyr Gly Ala Ala Arg Ala Val			
145	150	155	160
SerLeu Ala Val Trp Ala Leu Val Thr Leu Val Val Leu Pro Phe Ala			
165	170	175	
ValPhe Ala Arg Leu Asp Glu Glu Gln Gly Arg Arg Gln Cys Val Leu			
180	185	190	
ValPhe Pro Gln Pro Glu Ala Phe Trp Trp Arg Ala Ser Arg Leu Tyr			
195	200	205	
ThrLeu Val Leu Gly Phe Ala Ile Pro Val Thr Thr Ile Cys Ala Leu			
210	215	220	
TyrThr Thr Leu Leu Cys Arg Leu Arg Ala Ile Gln Leu Asp Ser His			
225	230	235	240
AlaLys Ala Leu Asp Arg Ala Lys Lys Arg Val Thr Leu Leu Val Ala			
245	250	255	
AlaIle Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Trp Thr Pro Tyr His Leu Ser			
260	265	270	
ThrIle Val Ala Leu Thr Thr Asp Leu Pro Gln Thr Pro Leu Val Ile			
275	280	285	
GlyIle Ser Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu			
290	295	300	
AsnPro Phe Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Asp Ser Phe Arg Arg Ser Leu			
305	310	315	320
ArgGln Leu Val Ser Cys Arg Ser Ala			
325	329		

<210>139

<211>987

<212>DNA

<213>Mouse

<400>139

```

atgcataacttaacgctttt cgagtctgga ggggacaacg tgtcttgagg cggtcatct 60
ttgggctgtcccaacgggtc cagcctgggt cctctgccgc tgccgcagcc actggcggta 120
gcagtgcctgtcgtctacgg ggtaatttgc gccgtgggac tggctggcaa ctctgcgggtg 180
ctgtacgtactgtctgcac gccgcgcagc aagactgtca ccaacgtgtt catcctcaac 240
ctggctatcgccgatgagct cttcacccctc gtgctgcccc tcaacatcgc ggacttcctg 300
ctgaggcgctggcccttcgg ggaggtcatg tgcaagctca ttgtagccgt cgaccagtac 360
aacactttctctagcctcta cttcctcgcc gtcagtgcgc ccgaccgata cctgggtggtt 420
ctggccacagcagagtcgcg ccgggtgtcc gggcgcaatt acggtgcagc gcgtgctgtc 480
agtctggcggtgtgggcgtt ggtgacgctg gtcgtgctgc cttttgcggg attcgctcgg 540
ctggacgaggagcagggtcg gcgccagtgc gtgctggtct tcccgagcc cgaggccttc 600
tggtggcggtgccagccgtct ctacacacta gtattgggtt ttgccatccc ggtgaccacc 660
atctgtgtctctataccac tctgtcttgc cgactgcgtg ctatccagct agatagccac 720
gccaaggccctggatcgtgc caagaagcgc gtgaccttgt tggtggcggc gattctgggt 780
gtgtgccctcctctgtggac gccttatcac ctgagtacca tagtggccct caccaccgac 840
ctccgcaaacgccgctggt catcggcacg tcttacttca tcaccagcct gagctatgct 900
aacagctgcctcaacccttt cctctatgcc ttctggacg acagcttccg cagaagcctc 960
cggcaattggtgtcatgccg ttcagcc 987
    
```

<210>140

<211>27

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>Probe

<400>140

tcctctgctggacaccgtac cacctga 27

<210> 141

<211> 32

<212> DNA

<213> ArtificialSequence

<220>

<223> Primer

<400> 141

atcgatatggacaacgcctc gttctcggag cc 32

<210> 142

<211> 32

<212> DNA

<213> ArtificialSequence

<220>

<223> Primer

<400> 142

actagtgtcaggctgccg cggaagtta tc 32

<210> 143

<211> 1000

<212> DNA

<213> Human

<400> 143

atcgatatgg acaacgcctc gttctcggag ccctggcccg ccaacgcata gggcccgac 60  
 ccggcgctgagctgtctcaa cgctcgact ctggcgccgc tggcgcgcc gctggcggg 120  
 gctgtaccagtgtgtctacgc ggtgatctgc gccgtgggtc tggcgggcaa ctccgccgtg 180  
 ctgtacgtgttgctgcgggc gccccgatg aagaccgtca ccaacctgtt cctcctcaac 240  
 ctggccatcgccgacgagct cttcacgtg gtgctgcca tcaacatgc cgacttcctg 300  
 ctgcggcagtgcccttcgg ggagctcatg tgcaagctca tcgtggctat cgaccagtac 360  
 aacaccttctccagcctcta cttcctcacc gtcatgagcg ccgaccgcta cctggtggtg 420  
 ttggccactgcggagtcgcg ccgggtggcc ggccgcacct acagcgccgc gcgcgcggg 480  
 agcctggccgtgtgggggat cgtcacactc gtcgtgtgc cttcgcagt cttcgcccg 540  
 ctagacgacgagcagggccg gcgccagtgc gtgctagtct ttccgcagcc cgaggccttc 600  
 tggtggcgcgagccgct ctacacgtc gtgctgggt tcgccatccc cgtgtccacc 660  
 atctgtgtcctctataccac cctgtgtgc cgctgcatg ccatgaggct ggacagccac 720  
 gccaaaggccctggagcgcg caagaagcgg gtgaccttc tggtgggtgc aatcctggcg 780  
 gtgtgcctcctctgtggac gccctaccac ctgagcacc tggtggcgct caccaccgac 840  
 ctcccgacgacccgctggt catcgtatc tcctacttca tcaccagcct gagctacgcc 900  
 aacagctgcctcaaccctt cctctacgcc ttctggagc ccagcttcg caggaacctc 960  
 cgccagctgataacttgccg cgcggcagcc tgacactagt 1000

<210> 144

<211> 328

<212> PRT

<213> Human

<400> 144

Met Asp Asn Ala Ser Phe Ser Glu ProTrp Pro Ala Asn Ala Ser Gly

1 5 10 15

Pro Asp Pro Ala Leu Ser Cys Ser AsnAla Ser Thr Leu Ala Pro Leu

20 25 30

Pro Ala Pro Leu Ala Val Ala Val ProVal Val Tyr Ala Val Ile Cys

35 40 45

特2002-093096

Ala Val Gly Leu Ala Gly Asn Ser AlaVal Leu Tyr Val Leu Leu Arg  
50 55 60  
Ala Pro Arg Met Lys Thr Val Thr AsnLeu Phe Ile Leu Asn Leu Ala  
65 70 75 80  
Ile Ala Asp Glu Leu Phe Thr Leu ValLeu Pro Ile Asn Ile Ala Asp  
85 90 95  
Phe Leu Leu Arg Gln Trp Pro Phe GlyGlu Leu Met Cys Lys Leu Ile  
100 105 110  
Val Ala Ile Asp Gln Tyr Asn Thr PheSer Ser Leu Tyr Phe Leu Thr  
115 120 125  
Val Met Ser Ala Asp Arg Tyr Leu ValVal Leu Ala Thr Ala Glu Ser  
130 135 140  
Arg Arg Val Ala Gly Arg Thr Tyr SerAla Ala Arg Ala Val Ser Leu  
145 150 155 160  
Ala Val Trp Gly Ile Val Thr Leu ValVal Leu Pro Phe Ala Val Phe  
165 170 175  
Ala Arg Leu Asp Asp Glu Gln Gly ArgArg Gln Cys Val Leu Val Phe  
180 185 190  
Pro Gln Pro Glu Ala Phe Trp Trp ArgAla Ser Arg Leu Tyr Thr Leu  
195 200 205  
Val Leu Gly Phe Ala Ile Pro Val SerThr Ile Cys Val Leu Tyr Thr  
210 215 220  
Thr Leu Leu Cys Arg Leu His Ala MetArg Leu Asp Ser His Ala Lys  
225 230 235 240  
Ala Leu Glu Arg Ala Lys Lys Arg ValThr Phe Leu Val Val Ala Ile  
245 250 255  
Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Trp ThrPro Tyr His Leu Ser Thr Val  
260 265 270  
Val Ala Leu Thr Thr Asp Leu Pro GlnThr Pro Leu Val Ile Ala Ile

特 2 0 0 2 - 0 9 3 0 9 6

275                      280                      285  
Ser Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ser TyrAla Asn Ser Cys Leu Asn Pro  
290                      295                      300  
Phe Leu Tyr Ala Phe Leu Asp Ala SerPhe Arg Arg Asn Leu Arg Gln  
305                      310                      315                      320  
Leu Ile Thr Cys Arg AlaAla Ala  
325                      328

<210> 145

<211> 32

<212> DNA

<213> ArtificialSequence

<220>

<223> Primer

<400> 145

atcgatatggacaacgcctc gttctcggag cc 32

<210> 146

<211> 21

<212> DNA

<213> ArtificialSequence

<220>

<223> Primer

<400> 146

tagaggctggagaaggtgtt g 21

<210> 147

<211> 21

<212> DNA

<213> ArtificialSequence

<220>

<223> Primer

<400> 147

catgaagaccggtcaccaacc t 21

<210> 148

<211> 19

<212> DNA

<213> ArtificialSequence

<220>

<223> Primer

<400> 148

ccagcgtgaagagctcgtc 19

<210> 149

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designedpeptide

<400> 149

Trp Phe Lys His Val Ala Ser Pro ArgTyr His Thr Val Gly Arg Ala

1

5

10

15

Ala Gly Leu Leu

20

<210>150

<211>60



<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>

<400>150

tggttcaagc acgtggcgag tccccgctaccacacggtgg gccgcgccg tggcctgctc 60

【図面の簡単な説明】

【図1】 Wakosil-II3C18HGカラムを用いたGPR8リガンドの最終段階の精製におけるHPLCのUV吸収と各ピークのGTP $\gamma$ S活性を示す。活性は矢印に示すピークに回収された。

【図2】 種々の濃度の23残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのCHO/GPR8細胞膜画分に対するGTP $\gamma$ S結合促進活性を示す。

【図3】 種々の濃度の30残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのCHO/GPR8細胞膜画分に対するGTP $\gamma$ S結合促進活性を示す。

【図4】 種々の濃度の23残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのCHO/GPR8細胞に対するcAMP産生抑制活性を示す。

【図5】 種々の濃度の30残基のGPR8リガンドペプチドのヒトホモログのCHO/GPR8細胞に対するcAMP産生抑制活性を示す。

【図6】 GPR8リガンドペプチドのヒトホモログ前駆体蛋白質cDNAの全塩基配列およびそれから翻訳されるGPR8リガンドペプチドのヒトホモログ前駆体受容体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。予想される23残基のGPR8リガンドのヒトホモログペプチドの配列を四角で示す。

【図7】 GPR8リガンドペプチドのブタホモログ前駆体蛋白質cDNAの全塩基配列およびそれから翻訳されるGPR8リガンドペプチドのブタホモログ前駆体受容体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。予想される23残基のGPR8リガンドのブタホモログペプチドの配列を四角で示す。

【図8】 GPR8リガンドペプチドのラットホモログ前駆体蛋白質cDNAの全塩基配列およびそれから翻訳されるGPR8リガンドペプチドのラットホモログ前駆体受容体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。予想される23残基のGPR8

リガンドのラットホモログペプチドの配列を四角で示す。

【図9】 GPR8リガンドペプチドのマウスホモログ前駆体蛋白質cDNAの全塩基配列およびそれから翻訳されるGPR8リガンドペプチドのマウスホモログ前駆体受容体蛋白質の全アミノ酸配列を示す。予想される23残基のGPR8リガンドのマウスホモログペプチドの配列を四角で示す。

【図10】 ヒトGPR8発現CHO細胞から調製した細胞膜画分を用いた、 $[^{125}\text{I}]$ で標識した23残基のヒトGPR8リガンドに対する23残基のヒトGPR8リガンドの結合阻害活性を示す図を示す。

【図11】 TGR26の疎水性プロット図である。

【図12】 hGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)のCHO/TGR26細胞に対するcAMP産生抑制活性を示す図である。図中、-○-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-△-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

【図13】 hGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)のCHO/TGR26細胞膜画分に対するGTP $\gamma$ S結合促進活性を示す図である。図中、-○-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-△-は、hGPR8L(1-30)を混合した場合を示す。

【図14】  $[^{125}\text{I}]$ で標識した23残基のヒトGPR8リガンドのTGR26発現CHO細胞から調製した細胞膜画分への結合に対する種々の濃度のhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)の結合阻害活性を示す図を示す。図中、-○-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-△-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

【図15】 種々の濃度の23残基および30残基のGPR8リガンドペプチドヒトホモログのCHO/GPR7細胞に対するcAMP産生抑制活性を示す。図中、-●-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-■-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

【図16】  $[^{125}\text{I}]$ で標識した23残基のヒトGPR8リガンドのヒトGPR7発現CHO細胞から調製した細胞膜画分への結合に対する種々の濃度のhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)の結合阻害活性を示す図

を示す。図中、-●-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-■-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

【図17】 hGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)のCHO/GPR7細胞膜面分に対するGTPγS結合促進活性を示す図である。図中、-●-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-■-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

【図18】 皮下に持続投与したhGPR8L(1-23)のラットの明期での摂餌量に対する作用を示す。図中、□はvehicle群を、■は、hGPR8L(1-23)群を示す。

【図19】 皮下に持続投与したhGPR8L(1-23)のラットの暗期での摂餌量に対する作用を示す。図中、□はvehicle群を、■は、hGPR8L(1-23)群を示す。

【図20】 皮下に持続投与したhGPR8L(1-23)のラットの1日の摂餌量に対する作用を示す。図中、□はvehicle群を、■はhGPR8L(1-23)群を示す。

【図21】 皮下に持続投与したhGPR8L(1-23)のラットの体重増加に対する作用を示す。図中、-○-はvehicle群を、-□-はhGPR8L(1-23)群を示す。

【図22】 皮下に持続投与したhGPR8L(1-23)のラットの体重増加に対する作用を示す。図中、-○-はvehicle群を、-□-はhGPR8L(1-23)群を示す。

【図23】 皮下に持続投与したhGPR8L(1-23)のラットの血中グルコース量、血中総コレステロール量および血中トリグリセリド濃度に対する作用を示す。○は各個体の数値、-は平均値を示す。

【図24】 腹腔内投与したhGPR8L(1-23)のラットの摂餌量に対する作用を示す。図中、白はvehicle群を、灰色は0.2mg投与群を、黒は2mg投与群を示す。また、\*は危険率5%で有意、\*\*は危険率1%で有意であることを示す。

【図25】 腹腔内投与したhGPR8L(1-23)のラットの体重増加量に

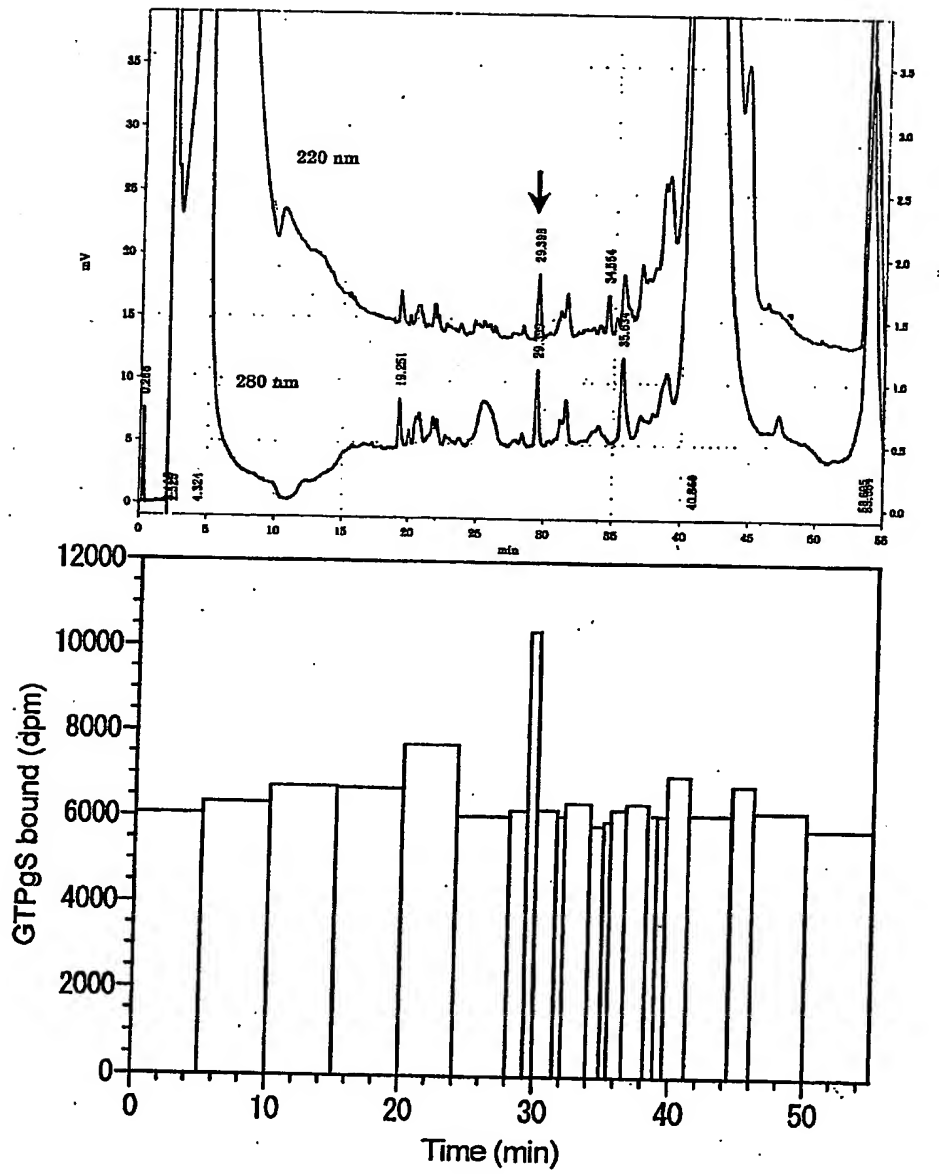
に対する作用を示す。図中、白はvehicle群を、灰色は0.2mg投与群を、黒は2mg投与群を示す。

【図26】  $[\text{Phe}^2, {}^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$  ヒトGPR8リガンド(1-20)のヒトGPR7発現CHO細胞から調製した細胞膜画分への結合に対する種々の濃度のhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)の結合阻害活性を示す図を示す。図中、-○-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-□-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

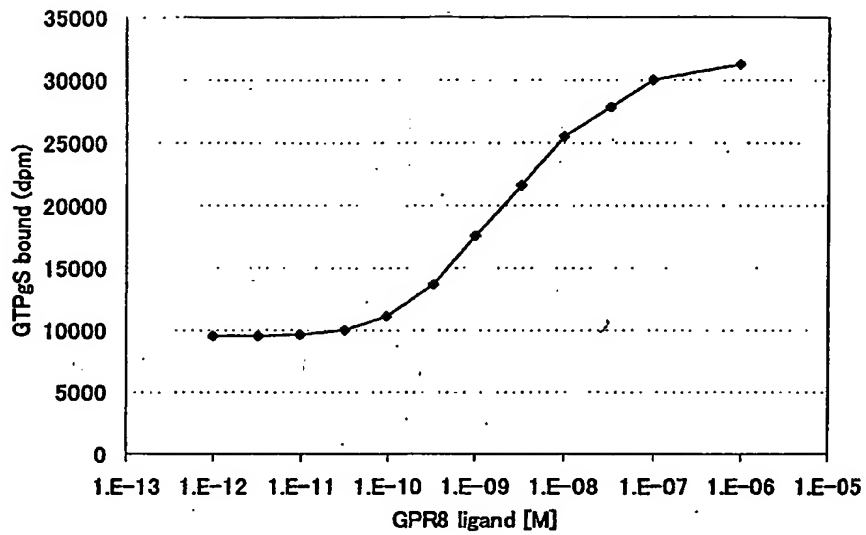
【図27】  $[\text{Phe}^2, {}^{125}\text{I-Tyr}^{10}]$  ヒトGPR8リガンド(1-20)のヒトGPR8発現CHO細胞から調製した細胞膜画分への結合に対する種々の濃度のhGPR8L(1-23)およびhGPR8L(1-30)の結合阻害活性を示す図を示す。図中、-○-は、hGPR8L(1-23)を投与した場合を、-□-は、hGPR8L(1-30)を投与した場合を示す。

【書類名】 図面

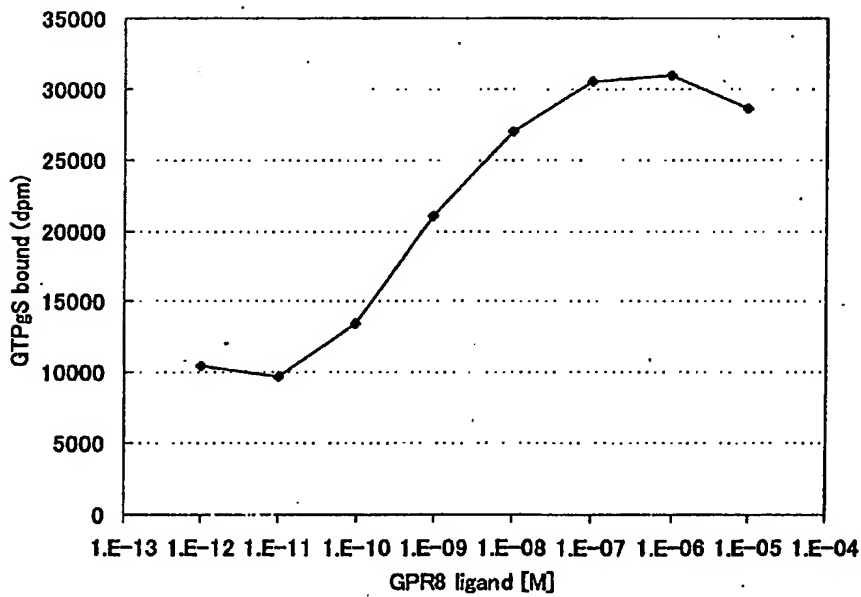
【図1】



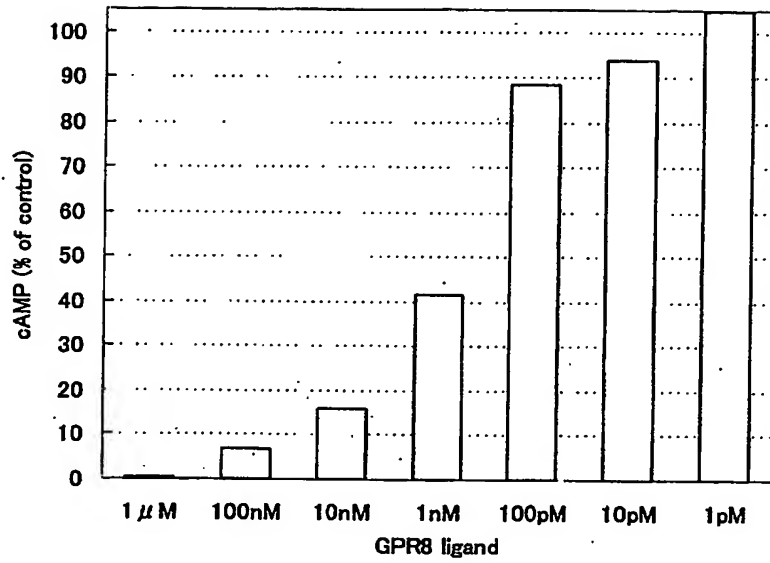
【図2】



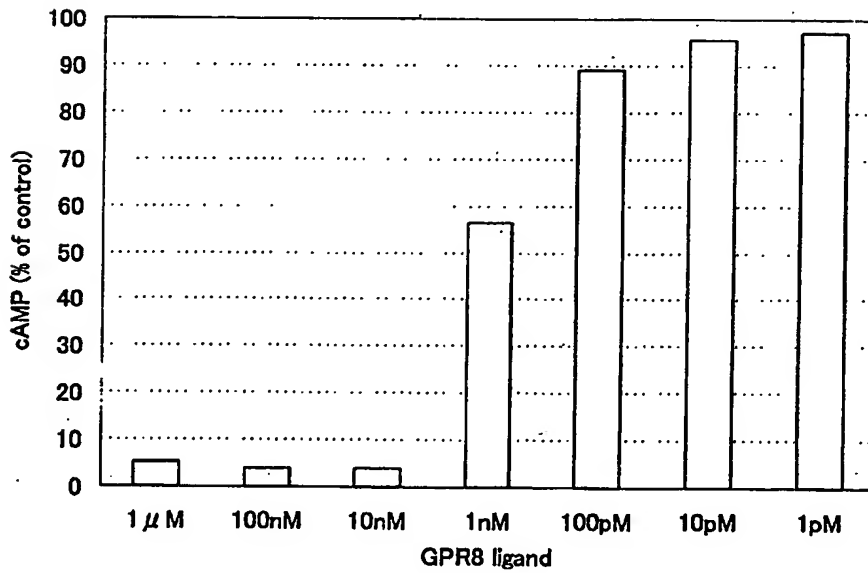
【図3】



【図 4】



【図 5】



【図6】

GGC GGC GCC ACC GAG CGG TTA TAG CTG GGC CTG CAG GGG ACC	42
CAC GGC TCG CCT CCA GCC TCC TGC GCT CCG GTA CCT GGG CGT CCC AAC TCC ACT GCG CGC	102
CCA AAC CCA GCC GAG CCG GTT CGT GGC CCG CCC CGC CGG GCG GCC GTC GAC GCG AGC GCC	162
CTG GCG TGG CGC CCA GGG GAG CGG GGG GCT CCC GCG AGC CGG CCG CGG CTG GCA CTG CTG	222
Leu Ala Trp Arg Pro Gly Glu Arg Gly Ala Pro Ala Ser Arg Pro Arg Leu Ala Leu Leu	20
CTG CTT CTG CTC CTG CTG CCG CTG CCC TCC GGC GCG TGG TAC AAG CAC GTG GCG AGT CCC	282
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ser Gly Ala Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro	40
CGC TAC CAC ACG GTG GGC CGC GCC GCT GGC CTG CTC ATG GGG CTG CGT CGC TCA CCC TAT	342
Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr	60
CTG TGG CGC CGC GCG CTG CGC GCG GCC GCG GGG CCC CTG GCC AGG GAC ACC CTC TCC CCC	402
Leu Trp Arg Arg Ala Leu Arg Ala Ala Ala Gly Pro Leu Ala Arg Asp Thr Leu Ser Pro	80
GAA CCC GCA GCC CGC GAG GCT CCT CTC CTG CTG CCC TCG TGG GTT CAG GAG CTG TGG GAG	462
Glu Pro Ala Ala Arg Glu Ala Prp Leu Leu Leu Pro Ser Trp Val Gln Glu Leu Trp Glu	100
ACG CGA CGC AGG AGC TCC CAG GCA GGG ATC CCC GTC CGT GCG CCC CGG AGC CCG CGC GCC	522
Thr Arg Arg Arg Ser Ser Gln Ala Gly Ile Pro Val Arg Ala Pro Arg Ser Pro Arg Ala	120
CCA GAG CCT GCG CTG GAA CCG GAG TCC CTG GAC TTC AGC GGA GCT GGC CAG AGA CTT CCG	582
Pro Glu Pro Ala Leu Glu Pro Glu Ser Leu Asp Phe Ser Gly Ala Gly Gln Arg Leu Arg	140
AGA GAC GTC TCC CGC CCA GCG GTG GAC CCC GCA GCA AAC CGC CTT GGC CTG CCC TGC CTG	642
Arg Asp Val Ser Arg Pro Ala Val Asp Pro Ala Ala Asn Arg Leu Gly Leu Pro Cys Leu	160
GCC CCC GGA CCG TTC TGA CAG CGT CCC CCG CCC GCC CGT GGC GCC TCC GCG CCT GAC CCA	702
Ala Pro Gly Pro Phe ***	165
GGA GGA GTG GCC GCG CG	719



【図7】

CC TCC GGA GCC AGT TCC TGG TCC GCC CCG CCG GGA GCC GTC AGC	44
ATG AAC CCC CCG GCA CGC GGC ATG GGA GCG CCG GGC CCG GGA CCG GGG GCC ACT GCG AGG	104
Met Asn Pro Arg Ala Arg Gly Met Gly Ala Arg Gly Pro Gly Pro Gly Ala Thr Ala Arg	20
CGC CCG CTG CTG GCA TTG CTG TTA CTG CTG CTG CTG CCG CTG CCC GCC CGT GCC	TGG 164
Arg Arg Leu Leu Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ala Arg Ala	Trp 40
TAC AAG CAC ACG GCG AGT CCC CGC TAC CAC ACG GTG GGC CGC GCC CCG GGC CTG CTC ATG	224
<u>Tyr Lys His Thr Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ala Gly Leu Leu Met</u>	60
GGG CTG CGC CCG TCG CCC TAC ATG TGG CGC CCG CCG CTG CCG CCG GCC GGG CCC CTG	284
<u>Gly Leu</u> Arg Arg Ser Pro Tyr Met Trp Arg Arg Ala Leu Arg Pro Ala Ala Gly Pro Leu	80
GCC TGG GAC ACT TTC GGC CAG GAC GTG CCC CCT CCG GGA CCC TCC GCC AGG AAC GCC CTC	344
Ala Trp Asp Thr Phe Gly Gln Asp Val Pro Pro Arg Gly Pro Ser Ala Arg Asn Ala Leu	100
TCT CCG GGG CCC GCC CCT CGC GAC GCT CCG CTG CTT CCC CCC GGG GTT CAG ACA CTG TGG	404
Ser Pro Gly Pro Ala Pro Arg Asp Ala Pro Leu Leu Pro Pro Gly Val Gln Thr Leu Trp	120
CAG GTG CGA CGC GGA AGC TTC CGC TCC GGG ATC CCG GTC AGT GCG CCC CGC AGC CCG CGC	464
Gln Val Arg Arg Gly Ser Phe Arg Ser Gly Ile Pro Val Ser Aal Pro Arg Ser Pro Arg	140
GCC CCG GGG TCC GAG CCG CAA CCG GAA TTG GGC GCC TCT TCC TGG ACC TCG GCG GAG TAG	524
Ala Arg Gly Ser Glu Pro Gln Pro Glu Leu Gly Ala Ser Ser Trp Thr Ser Ala Glu ***	159
ACC AGA GCC TTC GGA GAG TCT TCA GCT CAG CCG TGG TCT GC	565

特2002-093096

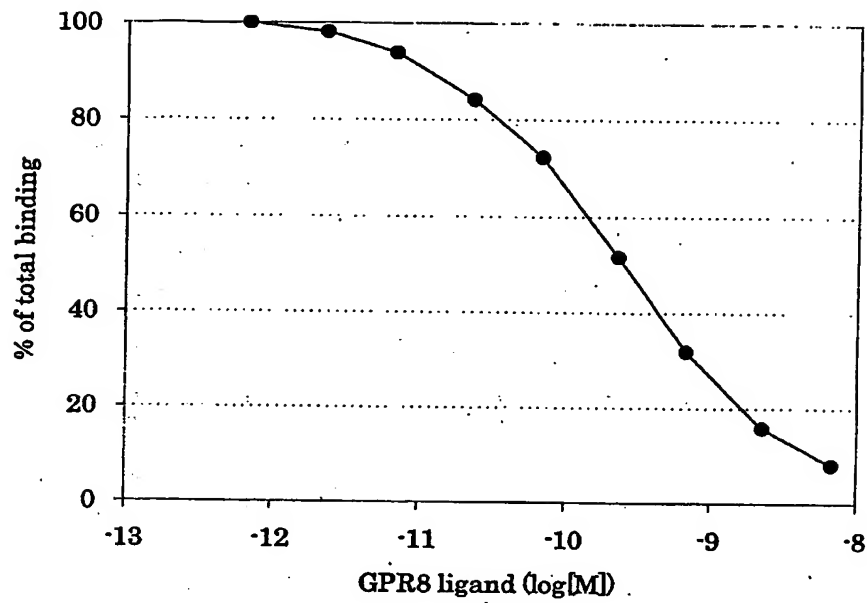
【図8】

TGT AGT CGC ACC AAC TGA CTA GTC TCT TCC ATC CTC	36
CGG AGC TCC GAC GTT CTC GGG GAC ATA AAC CCT GTT CTT GTC CTA ACC CGC CAA GGG GCC	96
ATG GAC TTG AGC GCG CTG GCG TCG AGC AGA GAA GTA CGG GGC CCT GGG CCC GGG GCT CCG	156
Met Asp Leu Ser Ala Leu Ala Ser Ser Arg Glu Val Arg Gly Pro Gly Pro Gly Ala Pro	20
GTG AAC CGG CCC CTG CTA CCG CTA CTG CTG CTT CTG CTC TTG CTA CCT CTG CCC GCC AGC	216
Val Asn Arg Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ala Ser	40
GCC TGG TAC AAG CAC GTG GCG AGC CCT CGC TAT CAC ACA GTG GGT CGT GCC TCC GGG CTG	276
Ala Trp Tyr Lys His Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ser Gly Leu	60
CTC ATG GGG CTG CGC CGC TCG CCC TAC CTG TGG CGC CGT GCC TTG GGT GGG GCC GCT GGA	336
Leu Met Gly Leu Arg Arg Ser Pro Tyr Leu Trp Arg Arg Ala Leu Gly Gly Ala Ala Gly	80
CCG CTC GTG GGG CTC CCG GGA CAG ATG GCC CGC AGC GCT CTC CTG CTT CCT TCC CCC GGG	396
Pro Leu Val Gly Leu Pro Gly Gln Met Ala Arg Ser Ala Leu Leu Leu Pro Ser Pro Gly	100
CAG GAG CTG TGG GAG GTA CGA AGC AGG AGT TCA CCG GCA GGA CTT CCC GTG CAT GCA ACC	456
Gln Glu Leu Trp Glu Val Arg Ser Arg Ser Ser Pro Ala Gly Leu Pro Val His Ala Thr	120
CGG AGT CTG CGG GAC CTG GAG GGA GCC GGC CAA CCT GAG CAG TCG CTA AGC TTT CAG TCC	516
Arg Ser Leu Arg Asp Leu Glu Gly Ala Gln Gln Pro Glu Gln Ser Leu Ser Phe Gln Ser	140
TGG ACT TCA GCA GAG CCC GCT GCT AGA GCC TTC GGT GAG ACG CTT CGT GCC CAG CCA TGG	576
Trp Thr Ser Ala Glu Pro Ala Ala Arg Ala Phe Gly Glu Thr Leu Arg Ala Gln Pro Trp	160
TTC CTG CAG CAA ATC ATC TTT GCC GAT CCT GTC AGG CTC GAC GAC CGT CTC AAG AAC CGA	636
Phe Leu Gln Gln Ile Ile Phe Ala Asp Pro Val Arg Leu Asp Asp Arg Leu Lys Asn Arg	180
TGG CGC CCC CGT GCT TGA CCT AAG CAG GAG CAC AGC TTG TAG CTC CAG	684
Trp Arg Pro Arg Ala ***	185

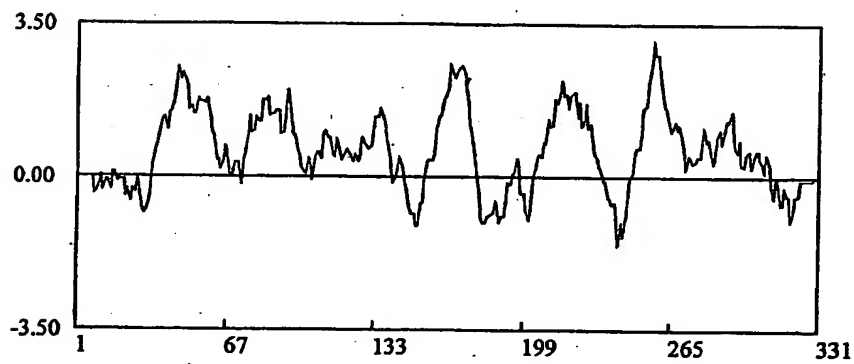
【図9】

TGA CTG GTC TCC ATC CTC TGG AGC TCC GAC GTG CTC GTT	39
CTC GGA GAC ATA AAC CCA GTT CTT GTC CTA ACC CTC CAA GGG GCA ATT GAC GTG AGC GCG	99
CTG GCG TCT AAC AGA GAA GTA CGG GGC CCT GGG CCC GGG ACT CCC AGG AAC CGG CCC CTG	159
Leu Ala Ser Asn Arg Glu Val Arg Gly Pro Gly Pro Gly Thr Pro Arg Asn Arg Pro Leu	20
CTG CCC CTG CTG CTG CTT CTG CTC TTG CTA CCG CTG CCC GCC AGC GCG	219
Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Pro Ala Ser Ala	40
TGG TAT AAG CAC	
Trp Tyr Lys His	
GTG GCG AGT CCC CGC TAT CAC ACA GTG GGT CGT GCC TCC GGG CTG CTC ATG GGG CTG	279
Val Ala Ser Pro Arg Tyr His Thr Val Gly Arg Ala Ser Gly Leu Leu Met Gly Leu	60
Arg	
CGC TCG CCC TAC CAG TGG CGC CGT GCC CTG GGC GGG GCT GCT GGA CCC CTC TCC CGG CTC	339
Arg Ser Pro Tyr Gln Trp Arg Arg Ala Leu Gly Gly Ala Ala Gly Pro Leu Ser Arg Leu	80
CCA GGA CCG GTC GCC CGC GGC GCT CTC CTG CTT CCT TCC TCA GGG CAG GAG CTG TGG GAG	399
Pro Gly Pro Val Ala Arg Gly Ala Leu Leu Leu Pro Ser Ser Gly Gln Glu Leu Trp Glu	100
GTA CGA AGC AGG AGC TCA CCT GCA GGG CTT CCC GTC CAT GCA CCC TGG AGT CCG CGG GAC	459
Val Arg Ser Arg Ser Ser Pro Ala Gly Leu Pro Val His Ala Pro Trp Ser Pro Arg Asp	120
CTG GAG GGA GTC CGC CAA CCG GAG CAG TCG CTA AGC CTT CAC TCC TGG ATC TCA GAG GAG	519
Leu Glu Gly Val Arg Gln Pro Glu Gln Ser Leu Ser Leu His Ser Trp Ile Ser Glu Glu	140
CCC GCT GCT AGA GCC TTC GGA GAG ACG CTT CGT GCC CAG CCA TGG TTC CTG CAG CAA GTC	579
Pro Ala Ala Arg Ala Phe Gly Glu Thr Leu Arg Ala Gln Pro Trp Phe Leu Gln Gln Val	160
ATC TTT GCC GAT CCT GTC AGG CCC AAG AAC CGA TGG CGC CCC CAT GCT TGA CCT AGG CAG	639
Ile Phe Ala Asp Pro Val Arg Pro Lys Asn Arg Trp Arg Pro His Ala ***	176
GAG CAC AGC TTG AAG CTC CA	659

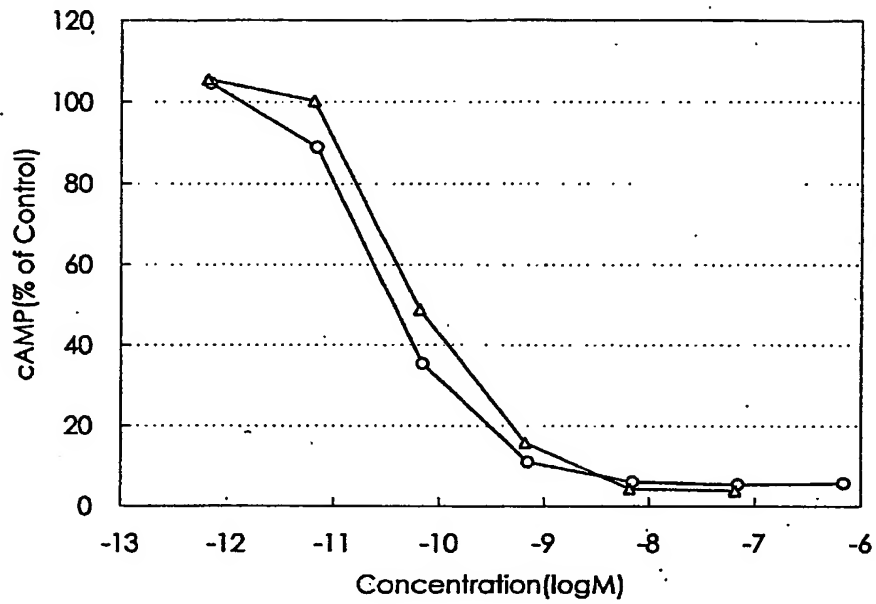
【図10】



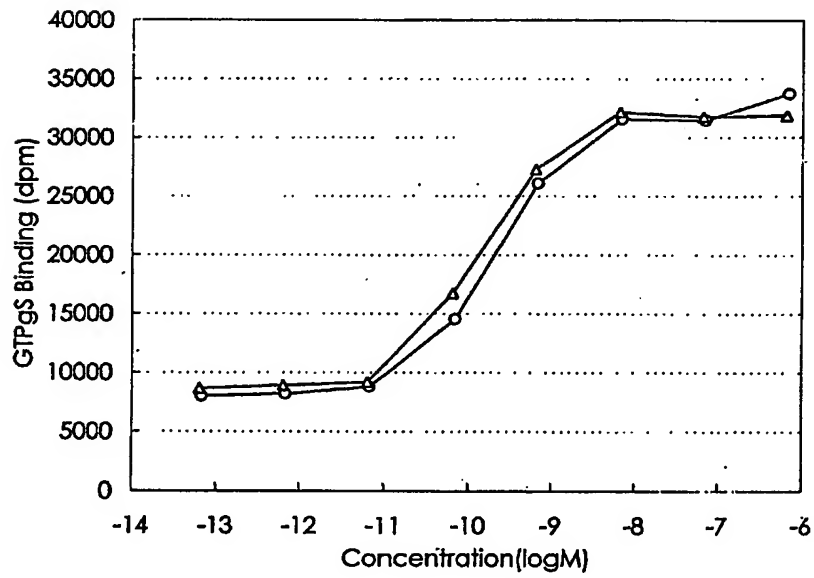
【図11】



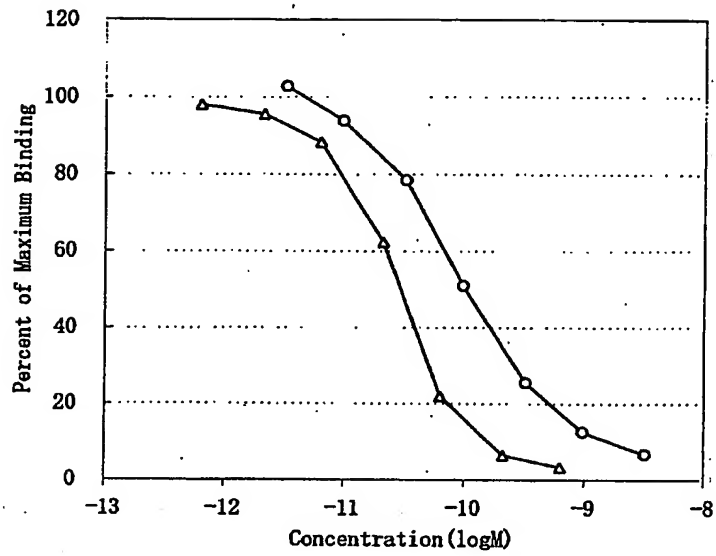
【図12】



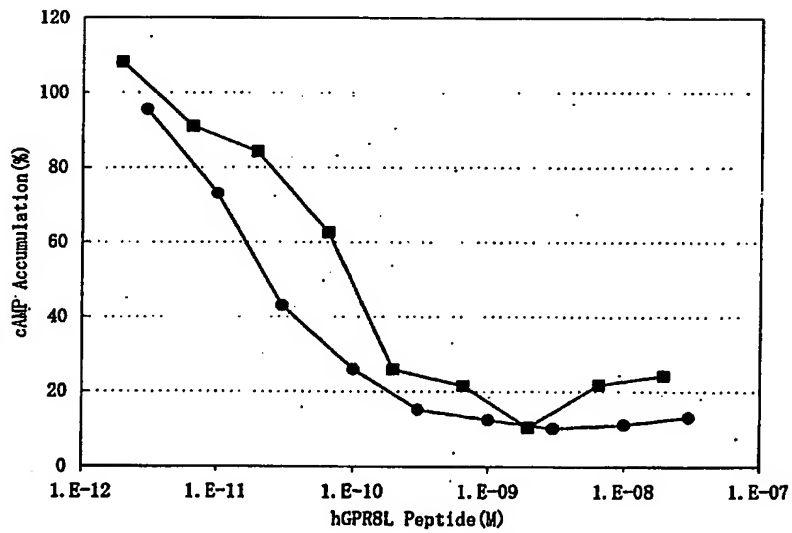
【図13】



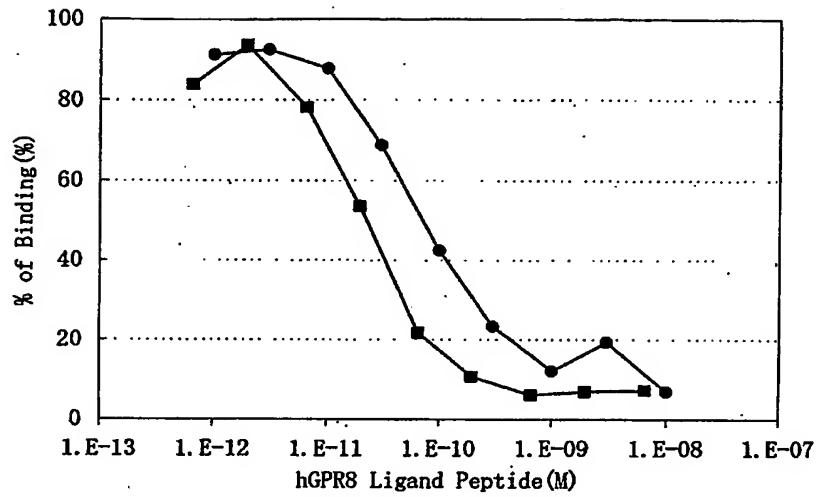
【図 14】



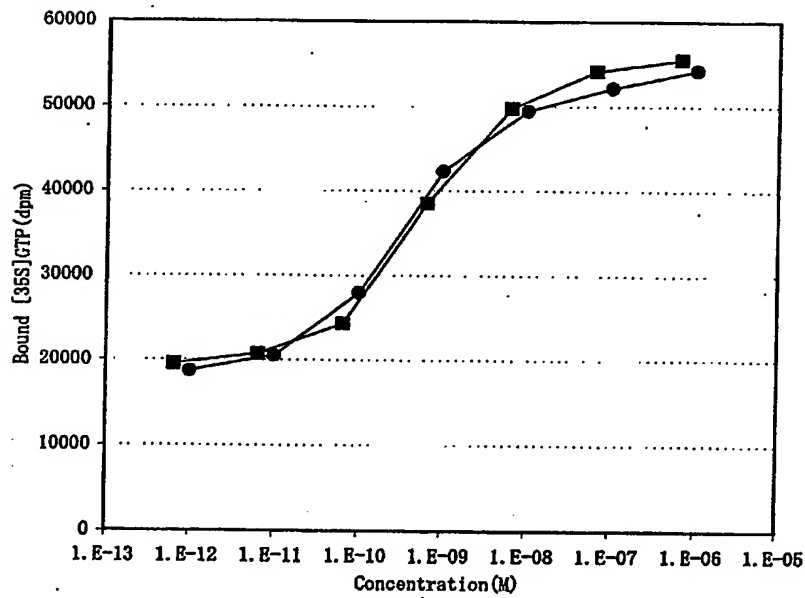
【図 15】



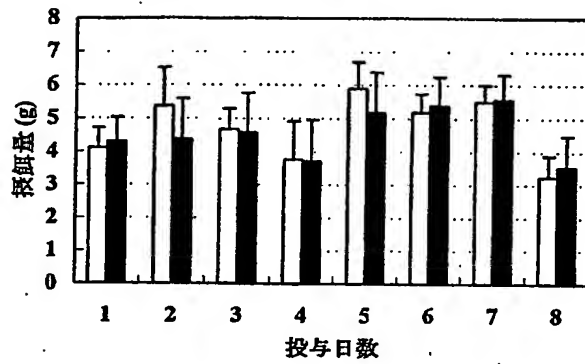
【図16】



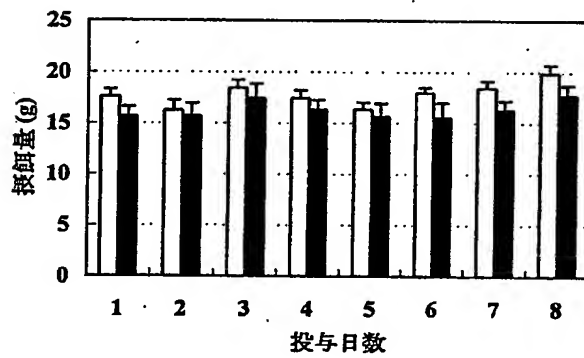
【図17】



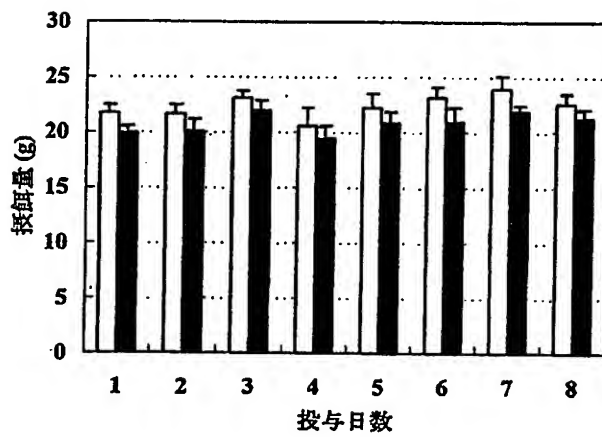
【図18】



【図19】

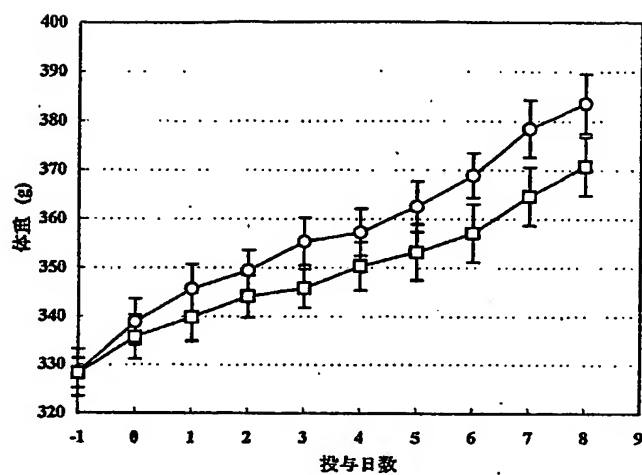


【図20】

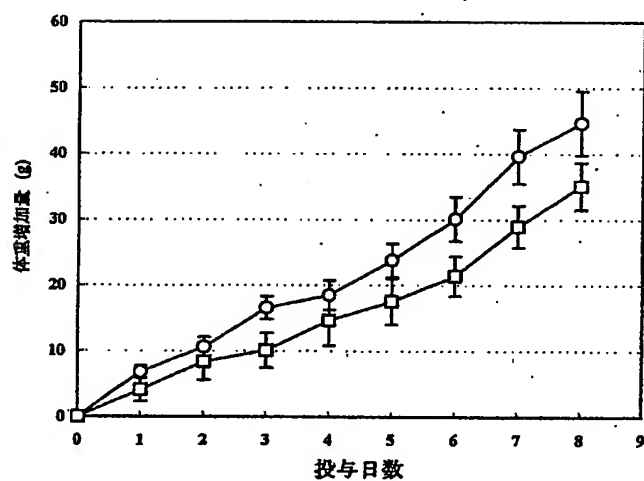




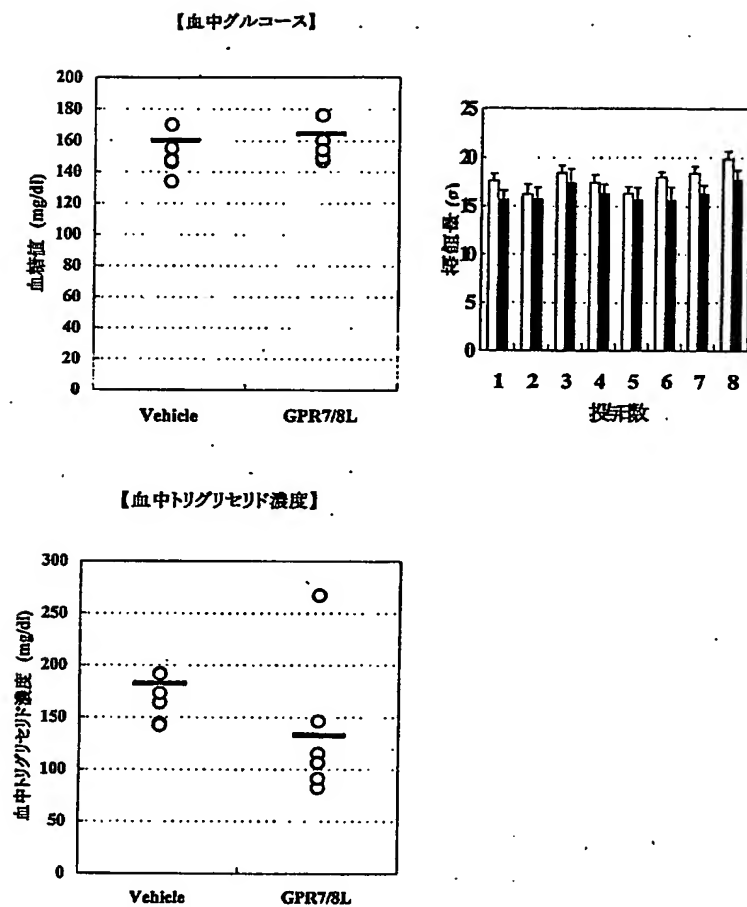
【図21】



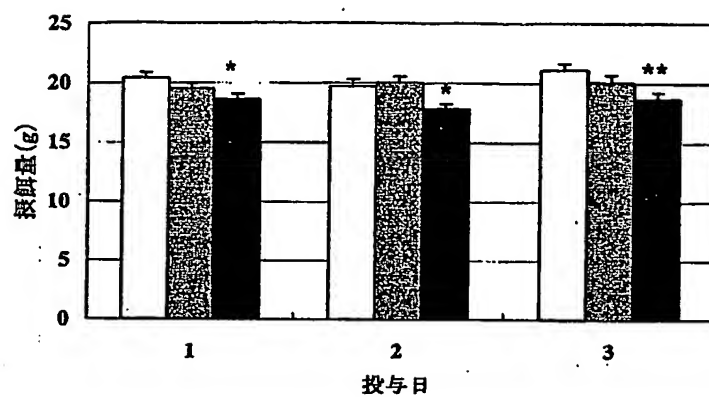
【図22】



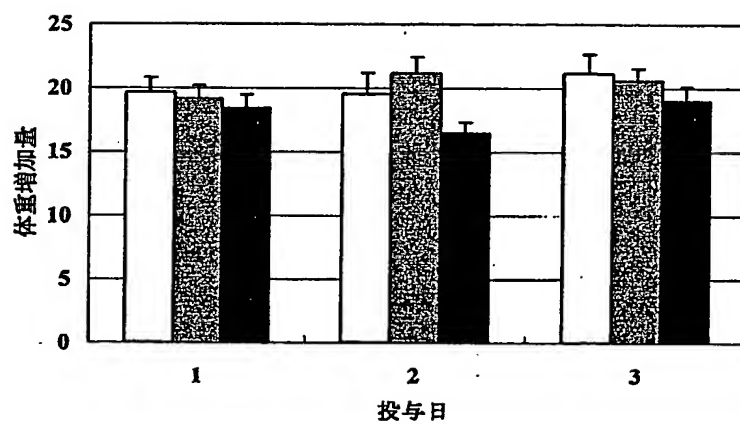
【図23】



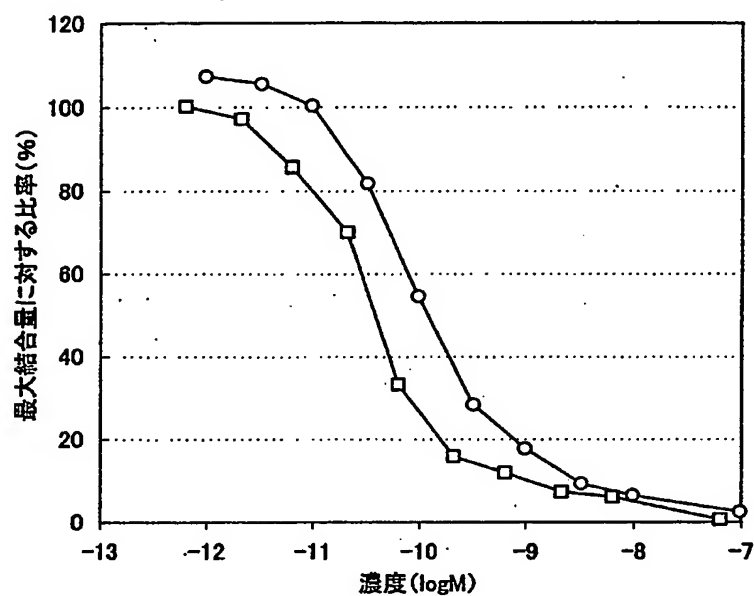
【図24】



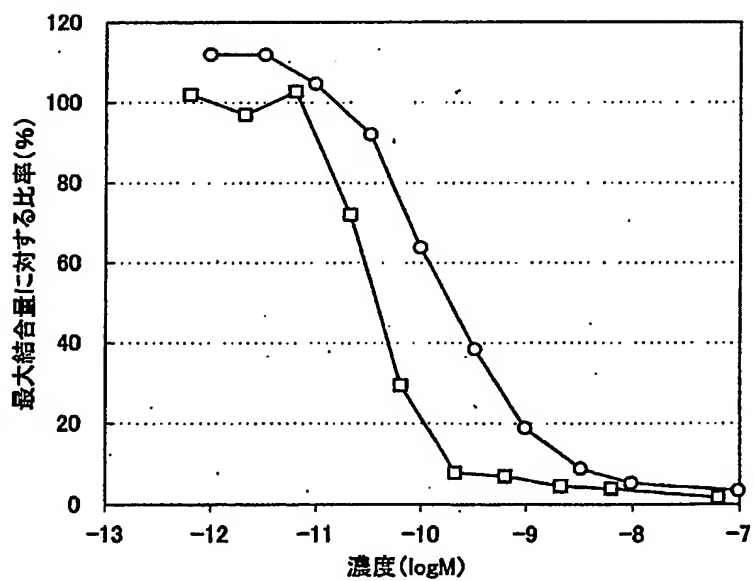
【図25】



【図 2 6】



【図 2 7】



特 2002-093096

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 体重増加抑制剤などの提供。

【解決手段】 本発明のリガンドは、優れた体重増加抑制剤などとして、あるいは優れた体重増加抑制薬などのスクリーニングなどに有用である。

【選択図】 なし

特2002-093096

出願人履歴情報

識別番号

[000002934]

1. 変更年月日	1992年 1月22日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
氏 名	武田薬品工業株式会社